

SÉRIE A, N° 1013

N° D'ORDRE : 1037

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

Michel ROBERT

1^{re} THÈSE. Contribution à l'étude des extraits
pancréatiques à action vagotonisante
et à action respiratoire

2^e THÈSE. PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 8 mars 1963 devant la Commission d'examen

MM. MONNIER

Président.

SOULAIRAC

TONNELAT

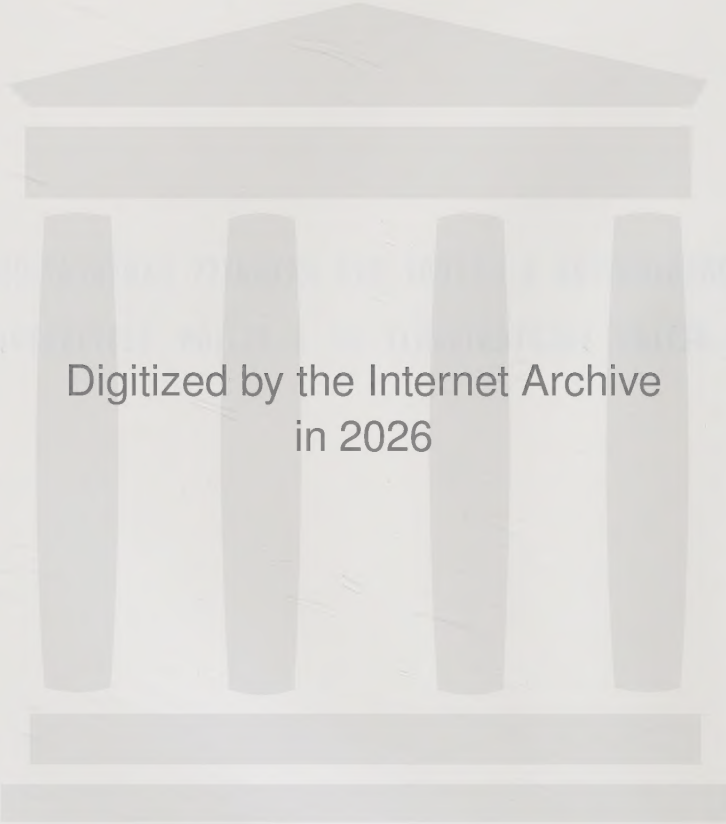
}

Examineurs.

EDITIONS MÉDICALES ET SCIENTIFIQUES
8, rue des Acacias - PARIS (17^{me})

1964

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES EXTRAITS PANCRÉATIQUES
A ACTION VAGOTONISANTE ET A ACTION RESPIRATOIRE**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A, N° 1013

N° D'ORDRE : 1037

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

Michel ROBERT

1^{re} THÈSE. Contribution à l'étude des extraits
pancréatiques à action vagotonisante
et à action respiratoire

2^e THÈSE. PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 8 mars 1963 devant la Commission d'examen

MM. MONNIER

Président.

SOULAIRAC

TONNELAT

} *Examineurs.*

EDITIONS MÉDICALES ET SCIENTIFIQUES
8, rue des Acacias - PARIS (17^{me})

1964



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

Professeurs

G. JULIA	T Analyse supérieure et algèbre supérieure.	BRELOT	T Calcul diff. et intégral.
PRENANT	T Anatomie et histologie compar.	NORMANT	T Chimie organique.
GRASSE	T Evolution des êtres organisés.	BENARD	T Chimie minérale.
PREVOST	T Chimie organique.	BUVAT	T Botanique (E. N. S.).
WYART	T Minéralogie et cristallographie	DUGUE	T Statistiques mathématiques.
TEISSIER	T Zoologie	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).	ULRICH	T Physiologie végétale.
AUGER	T Physique quantique et relativité.	MARECHAL	T Optique théorique et appliq.
MONNIER	T Physiologie générale.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
PIVETEAU	T Paléontologie.	CHADEFAUD	T Botanique.
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	Mlle LE BRETON	Physiologie de la nutrition.
CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	SALEM	Mathématiques générales.
LAFFITE	T Chimie générale.	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	DEVILLERS	T Anatomie et histologie comp.
COULOMB	T Physique du Globe.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
Mlle COUSIN	T Biologie animale (S. P. C. N.).	FRANÇON	T Physique (S. P. C. N.).
CHRETIEN	T Chimie minérale.	GLANCEAUD	T Géographie phys. et géol. dyna- mique.
DRACH	T Zoologie.	GODEMENT	T Mathématiques (M. P. C.).
KASTLER	T Physique (E. N. S.).	PISOT	T Techn. math. de la phys.
EPHRUSSI	T Génétique.	ROCH	T Géologie.
RIVIERE	T Géologie S. P. C. N. et Sédim.	SCHATZMAN	T Astrophysique.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P. C. B.)	TERMIER	T Paléontologie stratig.
LUCAS R.	T Recherches physiques.	ZAMANSKY	T Mathématiques générales.
THOMAS A.	T Biologie cellulaire.	LENNUIER	T Physique (M. G. P.).
ARNULF	T Optique appliquée.	RIZET	T Génétique.
MORAND	T Physique enseignement.	ROUTHIER	T Géologie appliquée.
SOLEILLET	T Physique (P. C. B.).	Mme TONNELAT	T Physique théorique.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	DIXMIER	T Mathématiques (M. P. C.).
DANJON	T Astronomie.	SOUGHAY	T Chimie générale.
PETIT	T Biologie maritime.	AIROIN	T Electrotechnique générale.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	BRUSSET	T Chimie systématique.
GALLIEN	T Embryologie.	M. LEVY	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
EICHORN	T Botanique.	Mme CHAIX	T Chimie biologique.
DE CUGNAC	T Biologie végétale (S. P. C. N.).	Mme HUREL-PY	T Biologie végétale (P. C. B.).
Mlle GAUCHOIS	T Chimie physique.	PIAUX	T Chimie (M. P. C.).
THELLIER	T Physique du Globe.	BRUN	T Mécanique théor. des fluides.
L'HERITIER	T Biologie générale (Orsay).	LEDERER	T Chimie biologique.
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay).	Mme DUBREIL	T Mathématique (Agré.).
PONCIN	T Mécanique générale.	Mme LE LONG	T Mathématiques II (E. N. S.).
DUBREIL	T Arithm. et théorie des nombres.	BELLAIR	T Géologie (S. P. C. N.).
QUELET	T Chimie organique.	COTTE	T Physique électricité.
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.	DUBOIS J. E.	T Chimie organique.
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.	LAMOTTE	T Zoologie (E. N. S.).
CUVILLIER	T Micropaléontologie.	MICHEL A.	T Chimie minérale (Orsay).
JUNG	T Pétrographie.	OLMER	T Energétique générale.
TRILLAT	T Microscopie et diffraction élec- tronique.	ROUAULT	T Electricité (Orsay).
WIEMANN	T Chimie organique et struc.	GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique cé- leste (Orsay).	BACHEWITZ	T Chimie Physique.
VASSY	T Physique de l'atmosphère.	BRUSSEL	T Physique atomique.
DESTOUCHES	T Théories physiques.	BUSER	T Physiologie comparée.
AMIEL	T Chimie générale.	CAMUS	T Physiologie végétale B. M. P. V.
HOCART	T Minéralogie et cristallographie.	CASTAING	T Physique II Thermod. (Orsay).
J. P. MATHIEU	T Physique optique.	CURIEN	T Minéralogie et Cristallographie.
COUTEAUX	T Biologie animale (P. C. B.).	MOYSE	T Evolution des êtres org.
MAY	T Zoologie (Orsay).	NOIROT	T Physiologie végétale (Orsay).
CHOQUET	T Théorie des fonctions et topo.	PANNETIER	T Chimie générale.
FELDMANN	T Biologie végétale marine.	POSSOMBES	T Zoologie.
GUINIER	T Physique des Solides (Orsay).	PULLMANN	T Chimie quantique.
JOST	T Physiologie comparée.	TEILLAC	T Physique nucl. et radio-activité.
FORTET	T Calcul des probabilités et phy- sique mathématique.	TONNELAT	T Biologie physico-chimique.
SCHARTZ	T Calcul différentiel et intégral.	VILLE	T Econométrie.
CHOUARD	T Physiologie végétale.	WILLEMART	T Chimie (P. C. B.).
MALAVARD	T Aviation (Techn. aéronautique).	DODE	T Chimie (Orsay).
		FREYMAN	T Recherches physiques.
		GUINOCHET	T Biol. vég. S. P. C. N. (Orsay).
		ROLLET	T Chimie minérale.

Mlle JOSIEN	T	Chimie S. P. C. N.	Mme CHOQUET-	T	Mécan. analytique et mécan.
CHEVALLEY	T	Géométrie algèbr. et théorie des groupes.	BRUHAT	T	céleste.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).	Mlle VEIL	T	Physiologie générale.
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).	LWOFF	T	Microbiologie.
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).	SIESTRUNCK	T	Mécan. physique et expérim.
DENY	T	Mathématiques génér. (Orsay).	LACOMBE	T	Métall. des métaux nucléaires.
GERMAIN	T	Mécanique théor. des fluides.	BROCHARD	T	Physique P. C. B. (Orsay).
LUCAS G.	T	Géologie.	CABANNES	T	Mécanique générale.
ALLARD	T	Chimie physique.	LESIEUR	T	Mathématiques I (Orsay).
BERTHELOT	T	Phys. des particules fond.	MAZET	T	Mécanique générale (Orsay).
BRICART	T	Météor. et phys. de l'atmosph.	CAIRE	T	Géographie phys. et géologie dynamique.
Mme ALBE-			COMOLET	T	Mécanique des fluides.
FESSARD	T	Psychophysiologie.	CORABEUF		Physiologie animale (Orsay).
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay).	DELLOUE		Physique de l'exosphère.
M. JULIA	T	Etudes des moléculaires natu- relles complexes.	GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
LENDER	T	Biologie animale S. P. C. N. (Orsay).	HOUILLON		Biologie animale P. C. B.
MAGAT	T	Physico-chimie des radio-élé- ments.	JULLIEN J.		Chimie S. P. C. N. (Orsay).
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.	MALGRANGE	T	Techn. math. de la physique (Orsay).
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	OLIVIER		Antropologie.
BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay).	NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	BLANC-LAPIERRE	T	Physique E. N. S. (Orsay).
CHARLOT	T	Chimie analytique.	CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay).
LEMEE	T	Physiologie végétale B. M. P. V. (Orsay).	KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).
GUERIN	T	Chimie M. P. C. (Orsay).	SAMUEL	T	Mathémat. E. N. S. féminines.
CHATELET M.	T	Chimie P. C. B.	KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay).
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay).	THIRY	T	Mécanique céleste.
MATTLER	T	Physique S. P. C. N.	ABELES		Physique S. P. C. N.
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).	AMAT		Physique P. C. B.
BERTEIN	T	Electronique (Orsay).	AUBOIN		Géologie.
BOUSSIÈRES		Chimie des radioéléments. (Orsay).	Mme BENOIT-		Physique nucléaire et radio- activité.
Mme COUTURE		Thermodynamique et méc. phys.	GUEUTAL		Biologie marine (Villefranche- sur-Mer).
ELLENBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe.	BOUGIS		
FRANC	T	Biologie animale P. C. B.	BRUHAT	T	Mathématiques M. P. C.
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay).	BRUNN	T	Géologie historique (Orsay).
STOLKOWSKI	T	Physiologie végétale.	CHABBAL		Physique M. G. P. (Orsay).
ACHER		Chimie biol. (Orsay).	DEHEUVELS	T	Mathématique propé. (Orsay).
BAUDOIN		Biologie animale (P. C. B.).	D'ESPAGNAT		Physique théorique (Orsay).
BEAUMONT		Biologie animale S. P. C. N.	FURON		Géologie S. P. C. N.
BLAMONT	T	Géophysique ionosphère.	Mme GANS	T	Génétique.
BOURREAU		Botanique.	GENEVES		Biologie végétale P. C. B.
CURIE D.		Physique M. G. P.	GUILBERT		Physique (C. U. S. Orléans)
DURAND-DELGA	T	Géologie.	HUPE		Pétrographie.
FREON	T	Chimie organique (Orsay).	HOLLANDE	T	Biologie générale.
HELLER	T	Physiol. végétale.	LIONS	T	Analyse numérique.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.	MAITTE		Chimie P. C. B.
CAILLEUX		Géologie (S. P. C. N.).	MEYER		Physique propédeutique.
MAGNAN	T	Physique S. P. C. N..	NICOLAS		Géologie appliquée.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliq. à la chimie théorique et à la physique nucléaire.	PANIGEL		Biologie générale.
		Biologie végétale S. P. C. N.	RAVIER		Pétrographie.
			ROSEAU	T	Mécanique théor. des fluides.
			ROUBINE		Electronique.
			SILBER	T	Chimie P. C. B.
			UEBERSFELD	T	Electronique.
			YVON	T	Théories physiques.

Le Secrétaire Général R. POULLAIN

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

MONSIEUR LE PROFESSEUR D. SANTENOISE

Directeur du Centre de Biologie Thermo-Climatique

a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et m'initier aux techniques physiologiques.

Il m'a inspiré et constamment guidé dans la réalisation de cette thèse avec autant de compétence que de bienveillance et de compréhension. Le présent travail porte l'empreinte de ses suggestions et de ses critiques constructives.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude et l'expression de mon sincère attachement.

Monsieur le Professeur A.M. MONNIER m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Par sa bienveillance, son intérêt humain sincère et sa touchante sympathie pour mon pays d'origine, il a contribué d'une façon décisive à la réalisation de ce travail. Je lui exprime ici ma profonde gratitude et ma respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur A. SOULAIRAC a bien voulu accepter d'être le rapporteur de cette thèse. J'ai toujours trouvé auprès de lui un accueil bienveillant, et il ne m'a ménagé ni ses conseils ni un temps particulièrement précieux. Je lui exprime ici ma reconnaissance la plus sincère.

Monsieur le Professeur J. TONNELAT a bien voulu m'apporter une aide efficace dans ce travail par la réalisation et l'interprétation des expériences d'ultracentrifugation, aussi bien que par l'examen et la critique des résultats expérimentaux. Je le prie de bien vouloir accepter mes remerciements reconnaissants.

Monsieur le Professeur R. GRANDPIERRE a bien voulu s'intéresser à mon travail et me faire profiter de ses vastes connaissances et de sa grande expérience dans la réalisation et l'interprétation de ce travail. Je dois en grande partie à son aide compréhensive dans tous les domaines d'avoir pu faire aboutir mes modestes efforts à un résultat positif.

Qu'il veuille bien recevoir l'assurance de mes sentiments respectueux, admiratifs et reconnaissants.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance au Docteur M. ROCHE pour les excellentes conditions de travail qu'elle m'a toujours assurées ainsi que pour ses encouragements qui ne m'ont jamais fait défaut.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Agrégé P. L. BIGET, tant pour le vif intérêt qu'il a toujours porté à mon travail que pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués.

Mme D. SANTENOISE m'a initié à la préparation des extraits sur lesquels j'ai travaillé. Il m'est particulièrement agréable de la remercier ici de ses conseils éclairés et de l'aide constante qu'elle m'a toujours apportée. Qu'elle me permette de lui exprimer ma profonde gratitude.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Docteur F. MEYER pour sa participation efficace à ce travail ainsi que les encouragements et l'amitié qu'il m'a toujours témoignés.

Je voudrais remercier le Docteur W. RAMANAMANJARY, qui m'a toujours conseillé avec beaucoup de sollicitude et qui m'a apporté dans la réalisation de ce travail une aide précieuse.

Je tiens à remercier M. et Mme BAZIN pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la présentation de ce travail.

Contribution à l'étude des extraits pancréatiques à action vagotonisante et à action respiratoire

INTRODUCTION

Après la découverte de l'insuline par BANTING et BEST, de nombreux chercheurs ont étudié les effets pharmacodynamiques de cette hormone. Les actions observées ont été nombreuses et variées, mais nous savons aujourd'hui, que les extraits pancréatiques de l'époque contenaient à côté de l'insuline de nombreuses autres substances. C'est précisément l'étude de l'action des premières insulines mal purifiées sur le système nerveux parasympathique qui a conduit D. SANTENOISE à la découverte de la vagotonine.

J. TINEL et D. SANTENOISE, ayant observé une tolérance remarquable au glucose chez les grands vagotoniques et des glycosuries avec des doses de glucose relativement faibles chez les hypovagotoniques (1), ont envisagé l'hypothèse d'une double action de la sécrétion interne du pancréas sur le métabolisme des hydrates de carbone d'une part, et sur le tonus et l'excitabilité parasympathiques d'autre part. La vérification expérimentale a permis de confirmer l'hypothèse, en effet, les insulines du moment possédaient une action vagotonisante indépendante de l'action sur la glycémie (2). Mais peu de temps après, ayant répété ces expériences avec des échantillons d'insuline cris-

tallisée selon la technique de ABEL, ces auteurs n'ont pu confirmer les résultats précédemment obtenus.

D'autres chercheurs ayant également étudié l'action de l'insuline sur le système nerveux autonome, ont obtenu eux aussi des résultats négatifs. M. POPPER par exemple, ayant mesuré le seuil de l'excitabilité du pneumogastrique par l'intensité minima nécessaire pour arrêter le cœur, n'a pas pu varier cette intensité seuil en présence d'insuline introduite dans la circulation (3).

Ces apparentes contradictions dans les résultats ont bientôt trouvé une explication satisfaisante. L'amélioration de la technique de préparation de l'insuline a permis d'attribuer à cette hormone l'action sur la glycémie, l'action vagotonisante appartenait manifestement à une substance autre que l'insuline (4). D. SANTENOISE et son école se sont attachés à l'étude de la fonction vagotonisante du pancréas. Il a été démontré que la substance pancréatique vagotonisante est de nature hormonale. Notamment il suffit de dépancréater un chien au réflexe oculo-cardiaque positif pour que ce réflexe disparaisse ou diminue considérablement. Mais la transfusion du sang d'un chien intact, ou le croisement par anastomose pancréatico-jugulaire de la circulation du chien dépancréaté avec un donneur intact, ou encore la greffe d'un pancréas au cou du chien dépancréaté rétablissent pour quelque temps chez ce dernier le réflexe oculo-cardiaque (5). La substance active responsable de cette action pouvait être isolée du pancréas de cheval et préparée sous forme d'un extrait dont les propriétés physiques, chimiques et biochimiques ont été décrites en détail (6).

L'étude minutieuse des actions de cet extrait sur l'homme et l'animal a montré que son action principale consiste à renforcer le tonus et l'excitabilité parasympathiques (7, 8). En ce qui concerne le tonus organo-végétatif, l'action se manifeste dans le ralentissement du rythme cardiaque, une vasodilatation, une baisse de la tension artérielle et une augmentation de la motricité intestinale. L'accentuation de la réflectivité vagale se traduit par le renforcement de l'effet cardio-modérateur de l'excitation du nerf de Héring, du bout central du nerf laryngé supérieur ou du nerf de Cyon, et surtout par un renforcement de l'effet cardio-modérateur de la compression des globes oculaires. Cette action cardio-modératrice facilement véri-

fiable par la pratique du réflexe oculo-cardiaque sur le lapin non anesthésié permet de titrer avec une grande précision l'activité vagotonisante dans les extraits pancréatiques (9). Pour tenter d'expliquer l'action de l'extrait sur le système nerveux végétatif, SANTENOISE et BOVET en 1941, POLONOVSKI, SANTENOISE et PELOU en 1943, ont montré que l'extrait vagotonisant inhibe l'action de la cholinestérase non spécifique du sérum. Cette inhibition s'observe à l'aide d'une technique titrimétrique *in vitro* d'une part, d'autre part *in vivo* chez le chien chez qui le pouvoir cholinestérasique du sérum baisse après injection d'extrait pancréatique vagotonisant (10, 11, 12).

Dans une série de travaux parus entre 1935 et 1937, SANTENOISE, GRANDPIERRE et d'autres ont rapporté une action érythropoïétique de l'extrait vagotonisant administré quotidiennement à la dose de 1 mg/kg. L'augmentation du nombre des globules rouges observée chez l'homme, le chien, le lapin et le cobaye sains, commence vers le troisième-quatrième jour, et vers le vingtième jour le nombre des globules rouges du lapin, par exemple, peut dépasser de 1 à 1,5 millions le chiffre témoin. Cette action s'observe également chez les animaux rendus anémiques par les sels de plomb. Le nombre des globules rouges reste élevé même un ou deux mois après la cessation des injections (13 à 18).

Une autre action intéressante de l'extrait vagotonisant consiste à faire régresser la stéatose hépatique des animaux dépancréatés. On sait depuis longtemps que l'insuline seule ne suffit pas pour maintenir en survie un chien complètement dépancréaté sans ajouter à son régime du pancréas cru ou certains extraits pancréatiques. SANTENOISE, ALBOT et d'autres ont démontré que l'adjonction de l'extrait vagotonisant à l'insuline prolonge considérablement la survie des animaux dépancréatés et empêche l'apparition de la surcharge graisseuse hépatique ou fait régresser celle-ci, quand elle existe déjà. Cette action de l'extrait pancréatique ne s'observe que quand la stéatose hépatique est due à la suppression de la sécrétion interne du pancréas. Par contre quand la surcharge graisseuse a une autre étiologie, par exemple régime alimentaire déséquilibré, l'extrait pancréatique vagotonisant reste sans effet (19 à 22).

Au cours des expériences avec l'extrait vagotonisant deux autres actions se sont manifestées, notamment sur le

taux de glycémie et la respiration des animaux. Il est apparu au cours des recherches ultérieures que ces actions présentes dans l'extrait vagotonisant ne sont pas dues à la vagotonine proprement dite.

Il a été remarqué notamment, que la préparation d'un extrait pancréatique vagotonisant à partir du pancréas de bœuf donne un produit capable d'augmenter l'excitabilité respiratoire des cobayes par le gaz carbonique à la dose de 0,1 mg/kg alors qu'il faut 8 mg/kg pour augmenter l'excitabilité réflexe vagale chez le lapin. Le rapport des doses nécessaires pour déclencher ces deux actions est exactement inverse avec les préparations obtenues en partant du pancréas de cheval (23). Cette constatation a amené D. SANTENOISE et ses collaborateurs à dissocier de la vagotonine une substance active sur la respiration mais sans action sur le système nerveux végétatif (24).

SANTENOISE et ROBELET ont démontré la nature hormonale de cette action respiratoire en prouvant tout d'abord, que l'ablation totale du pancréas du chien amène une diminution de l'excitabilité des centres respiratoires par le CO_2 , et en rétablissant ensuite l'excitabilité normale par transfusion du sang éfférent du pancréas d'un donneur intact, par transplantation d'un pancréas au cou du chien dépancraté ou encore par croisement de la circulation sanguine d'un chien dépancraté et d'un chien intact à l'aide d'anastomoses carotido-carotidiennes et jugulo-jugulaires (25). La mise au point d'une technique d'extraction et de purification d'un extrait à partir du pancréas de bœuf a permis d'obtenir une préparation très active sur l'excitabilité respiratoire, mais sans action sur la glycémie, le système nerveux végétatif et sur l'activité de la cholinestérase sérique (26, 27). L'action de cet extrait sur l'excitabilité des centres respiratoires par le gaz carbonique peut être titrée sur le cobaye non anesthésié et non contenu à l'aide d'une technique originale dite « test au CO_2 » (28).

L'étude expérimentale de l'action respiratoire de l'extrait pancréatique, décrite dans la thèse de P. ETIENNE (29), consiste en la mise en évidence d'une augmentation du rythme, du débit et de l'amplitude respiratoires après injection d'extrait respiratoire, ainsi que d'une influence sur le contrôle réflexe de la respiration et une action sur le contrôle chimique du centre respiratoire. L'action sur le contrôle réflexe de la respiration a été étudiée d'abord sur l'animal intact. On peut observer une diminution de l'efficacité du réflexe de Héring et Breuer inhibiteur de la

respiration, mais une augmentation du réflexe du même nom stimulant la respiration. On constate une diminution de l'inhibition de la respiration par excitation faradique du bout central du nerf pneumogastrique, du nerf de Héring ou après inhalation de brome, d'ammoniaque ou de chloroforme. Augmentent par contre sous l'influence de l'extrait respiratoire l'amélioration de la respiration après occlusion temporaire des carotides primitives, et l'effet respiratoire du gaz carbonique sur le sinus carotidien. Ces actions respiratoires subsistent, mais se produisent avec retard après la section des troncs vago-sympathiques, ou bien après section en deux temps des troncs vago-sympathiques et des nerfs de Héring, ou encore quand les troncs vago-sympathiques sont sectionnés, les sinus carotidiens éternés, suivie de la section lente des cordons postérieurs de la moëlle juste au-dessus de l'émergence des premières racines cervicales.

Par la suite, en pratiquant le « test au CO_2 » chez le chien en anesthésie limite continue au chloralose, SANTENOISE, GRANDPIERRE et d'autres ont montré que l'injection de l'extrait pancréatique respiratoire est suivie d'une augmentation de l'excitabilité des centres respiratoires par le gaz carbonique (30). SANTENOISE, BIGET et d'autres ont mesuré la ventilation pulmonaire chez l'homme avec l'appareil « Pulmotest » de GODDARD et chez le chien anesthésié avec le spiromètre de VERDIN. Ils ont vu la ventilation augmenter après injection d'extrait respiratoire (31). SANTENOISE et BIGET ont également étudié le pouvoir oxyphorique du sang en dosant avec l'appareil de VAN SLYKE la quantité maxima d'oxygène que peut fixer le sang saturé d' O_2 au contact de l'air ambiant. Ils ont trouvé chez beaucoup d'asthmatiques des pouvoirs oxyphoriques très bas et ont vu la saturation en oxygène du sang de ces malades s'améliorer après traitement plus ou moins prolongé avec l'extrait pancréatique respiratoire (32).

C'est en partant de ces données, accumulées depuis la découverte de la vagotonine vers 1924, que nous avons pu nous-mêmes contribuer expérimentalement à l'étude des extraits pancréatiques à action vagotonisante et respiratoire. Nous étions amené à nous intéresser plus particulièrement à l'étude physicochimique des deux extraits, à l'étude statistique des tests qui servent au titrage de leur activité, à la démonstration de la présence de l'activité caractéristique de chacun des extraits dans une fraction du sérum du chien. Nous avons également étudié l'action de

l'extrait vagotonisant sur la glycémie et le glycogène hépatique, sur la contraction du muscle lisse et sur la perméabilité capillaire, ainsi que l'inhibition de l'action de l'anhydrase carbonique par l'extrait respiratoire et finalement l'action diurétique de ce dernier extrait.

EXTRAIT PANCREATIQUE A ACTION VAGOTONISANTE

I. — ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT PANCREATIQUE VAGOTONISANT

Les propriétés physiques, chimiques et les principales réactions chimiques de l'extrait pancréatique vagotonisant ont été précisées par D. SANTENOISE dès 1942 (6). Comme ces analyses ont montré la nature protidique de l'extrait vagotonisant, nous avons soumis celui-ci à quelques critères de pureté habituelles de la chimie des protéines. Notre étude comporte des courbes de précipitation fractionnée, des électrophorèses, une série d'ultracentrifugations analytiques, le dosage des lipides extractibles et finalement une étude chromatographique des acides aminés qui composent l'extrait pancréatique vagotonisant.

Courbes de précipitation fractionnée

Dans nos expériences de précipitation fractionnée, nous avons utilisé deux sels, le SO_3Li_2 et le SO_4Mg , les deux en solution aqueuse saturée à chaud et refroidie ultérieurement à la température choisie pour l'expérience, qui était de 4° C. le pH variait de 2,5 à 2,8, étant donné que l'extrait vagotonisant ne précipite pas au-dessus de pH 3,0. La concentration de l'extrait analysé variait de 1 à 10 %.

Dans une série de 15 à 20 tubes à centrifuger, nous avons mélangé la solution d'extrait pancréatique, les quantités croissantes de la solution saline et la quantité d'eau distillée nécessaire pour amener le volume total à 10 ml pour les concentrations protéiques faibles (1-2 % ou à 15 ml pour les concentrations plus fortes. Le pH des solutions utilisées était préalablement ajusté avec de l' SO_4H_2 N. Nous avons contrôlé le pH après avoir mélangé les solutions et nous avons constaté qu'il approchait la valeur prévue à 1 ou 2 dixièmes d'unités près.

Nous avons abandonné les tubes à la chambre froide à 4° C pendant 12 heures, ensuite nous avons centrifugé les

tubes pendant 5 mn à 5 000 t/mn et dosé l'azote dans le surnageant selon la microméthode de KJELDAHL (35).

En maintenant constantes la température et la concentration protidique ainsi que le pH, la solubilité des protides est fonction de la concentration du sel précipitant selon l'équation (1) de COHN (34). S est la solubilité du

$$1) \log S = \beta - K's \mu$$

$$2) \mu = \frac{1}{2} \sum V C_i$$

V = électrovalence.

C_i = concentration en ion-gramme pour 1.000 g d'eau

extrait vagotonisant 15 NF

10,0

conc. 10 p 100 ; pH 2,5 ; sel: SO₄ Mg;

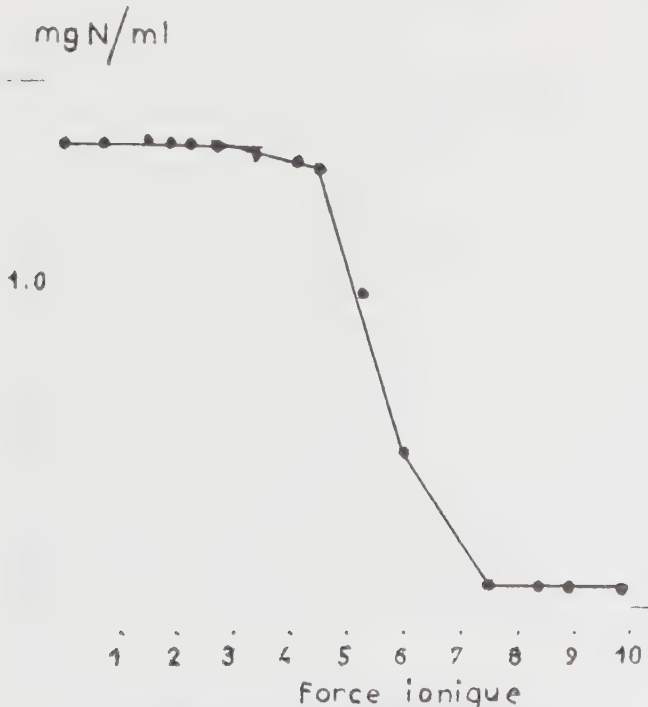


FIG. 1 : Précipitation fractionnée d'un extrait pancréatique avec le SO₄Mg.

protide, μ la force ionique de la solution (équation 2). β est une constante qui égale $\log S$ pour une force ionique nulle. C'est la solubilité hypothétique du protéide en absence de sels qui s'obtient par extrapolation du tracé vers l'axe des ordonnées. La valeur de β dépend du pH et de la température et elle est généralement minimum au point isoélectrique du protéide. $K's$ est la constante de précipitation saline, elle se mesure par la pente de la courbe et exprime les variations de la solubilité du protéide en fonction de la force ionique.

Nous avons calculé la force ionique pour chaque tube selon l'équation 2) en tenant compte du sel employé et de l'acide ajouté pour l'ajustage du pH. Ensuite, nous avons porté sur papier semi-logarithmique les forces

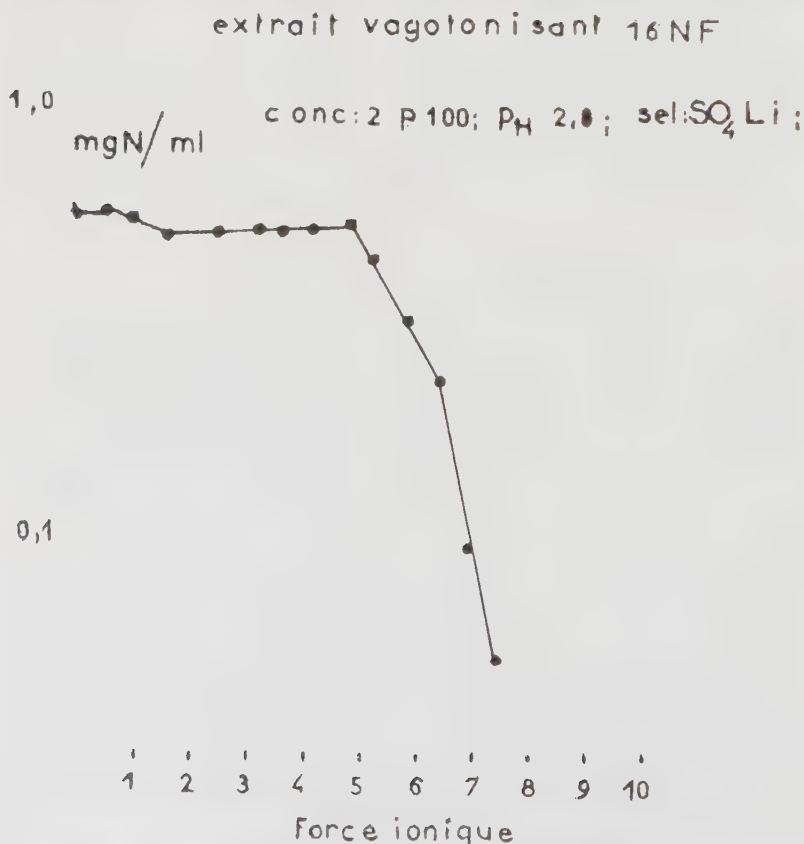


FIG. 2: Précipitation fractionnée d'un extrait pancréatique avec le $SO_4 Li_2$.

ioniques en abscisses et en ordonnées les concentrations d'azote exprimées en mg/ml.

Sur papier semi-logarithmique à une protéine homogène correspond une droite. Si la substance étudiée contient plusieurs constituants, on trouve sur le tracé plusieurs droites ayant des pentes différentes.

La fig. 1 représente le tracé obtenu par traitement à pH 2,5 avec le SO_4Mg d'une solution d'extrait à 10 % ; la fig. 2 montre le résultat d'une autre expérience avec le SO_4Li_2 à pH 2,8 et avec une solution d'extrait à la concentration de 2 %.

Dans les deux cas, ainsi que dans plusieurs autres expériences, nous avons obtenu 3 fragments de droites. Nous en concluons que l'extrait vagotonisant renferme au moins 3 constituants de propriétés de solubilité différentes.

Analyse électrophorétique

Au cours de la préparation d'un extrait vagotonisant nous avons prélevé une petite quantité de substance à chaque stade de la préparation. Après une dialyse de 48 heures contre un tampon véronal-véronal sodé de pH 8,6 et de force ionique 0,1, ces échantillons ont été soumis à l'analyse électrophorétique en milieu libre (*) dans ce même tampon à la température de 4° C sous une tension de 200 V avec une intensité de 20 mA pendant 10 000 à 11 000 secondes. La courbe obtenue à l'aide du dispositif de Philpot et Svenson a été décomposée en courbes de Gauss, dont la surface a été déterminée par planimétrie.

La technique actuelle de préparation d'un extrait pancréatique vagotonisant a été élaborée en 1954 par modification d'anciennes techniques décrites dès 1930 (8, 33). En gros cette technique consiste à extraire les protéines du pancréas de cheval congelé par une macération hydro-alcoolique et les précipiter par saturation au Cl Na d'abord, et ensuite, après redissolution, par un mélange d'alcool-éther. Ce dernier précipité, séché dans le vide, est l'extrait brut, dont le poids varie de 6 à 10 g par kg de pancréas traité. L'extrait brut se sépare à l'électrophorèse en milieu libre en 8 à 9 fractions de mobilités électrophorétiques différentes.

(*) Nous remercions M. de MANDE d'avoir bien voulu réaliser et interpréter ces électrophorèses.

On élimine de l'extrait brut redissout, neutralisé et dialysé d'abord une impureté par addition de 15 à 20 vol. % d'alcool absolu, puis de l'insuline par précipitation iso-électrique. La solution mère est ensuite acidifiée à pH 2,5, refroidie à 5° C et reçoit la moitié de son volume d'une solution de Cl Li à 50 %. Il se forme un abondant précipité blanc qui une fois centrifugé et séché représente la substance vagotonisante au stade que nous appelons α . A l'électrophorèse l'extrait α ne se sépare plus qu'en 3 fractions (tableau 1), et l'unité vagotonisante est contenue dans 50 γ d'extrait seulement.

TABLEAU I

Stade de la préparation	1ère fraction		2ème fraction		3ème fraction	
	Mobili- té	%	Mobili- té	%	Mobili- té	%
α	2,6	25,6	3,1	68,0	3,8	6,4
β	2,3	16,0	2,9	77,3	3,6	6,8
γ	2,3	22,2	2,8	68,9	3,4	8,9
δ	2,6	18,4	3,1	69,0	3,9	12,6

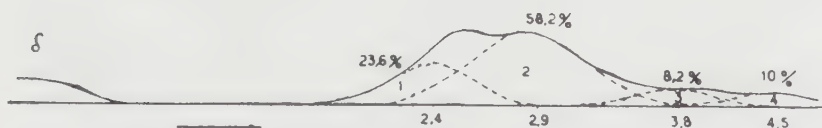
Mobilités électrophorétiques et pourcentages des fractions d'un extrait pancréatique vagotonisant (F 7126) aux diverses phases de sa préparation.

La suite de la préparation comporte des relargages au Cl Li. L'extrait α en solution à la concentration de 10 à 20 % est additionné de la moitié de son volume d'une solution de Cl Li à 50 %. Le précipité qui se forme, est centrifugé, redissout et reprécipité par l'alcool et séché sous vide. En effectuant cette précipitation au Cl Li une première fois à pH 2,6, une seconde fois à pH 2,7 et une troisième fois à pH 2,8, on obtient l'extrait vagotonisant aux stades de purification appelés β , γ et δ . Au stade δ , 10 γ de poudre contiennent l'unité vagotonisante, mais l'électrophorèse sépare toujours 3 pics dont l'aspect et les proportions n'ont pas beaucoup varié depuis le stade α (tableau I).

La purification se termine par l'élimination des traces d'insuline par formation d'un complexe insuline-ferrocyanure de potassium. A ce stade final l'unité vagotonisante

des meilleures préparations peut se trouver parfois dans moins de 10 γ de substance sèche. L'électrophorèse à ce stade final de la purification d'un extrait différent de celui que nous avons suivi de l'extraction jusqu'au stade δ, montre la présence de 4 fractions dans cet extrait (fig. 3).

Branche montante.



Branche descendante.

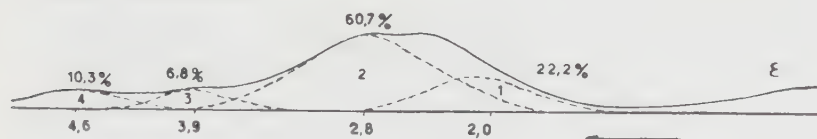


FIG. 3: Electrophorèse en milieu libre de l'extrait vagotonisant 16 NF.

Les trois premières fractions sont superposables à celles présentes aux stades antérieurs de la purification. C'est la fraction à la mobilité électrophorétique la plus élevée qui apparaît après le traitement au ferrocyanure.

Nous avons réuni dans le tableau II les doses seuils contenant l'unité vagotonisante, et les pourcentages des

TABLEAU II

Préparation	Dose seuil	Mobilité électrophorétique des fractions					Nombre total des fractions
		2, 1	2, 4-2, 6	2, 9-3, 1	3, 8-3, 9	4, 5	
F 7126	1/50mg/kg	-	18,4 %	69,0 %	12,6 %	-	3
16	1/50mg/kg	10 %	27,0 %	50,0 %	13,0 %	-	4
16 NF	1/75mg/kg	-	23,6 %	58,2 %	8,2 %	10 %	4

Doses seuils et pourcentages des différentes fractions de trois préparations d'extrait pancréatique à action vagotonisante.

différentes fractions pour trois préparations d'extrait vagotonisant. Les mobilités électrophorétiques des trois fractions communes aux trois préparations sont comprises entre 2,4 et 3,9. Ces vitesses de migration correspondent approximativement à celles des globulines β sériques. La préparation 16 NF, qui a l'activité pondérale la plus élevée, ne possède aucune des 3 fractions communes en quantité plus importante que les autres préparations.

Aucun des extraits soumis à l'électrophorèse n'a montré de pic migrant à la vitesse élevée de l'insuline. Cette hormone n'est donc pas présente, tout au moins sous forme d'insuline libre, en quantité décelable par l'électrophorèse, c'est-à-dire 1 % au moins de la substance analysée.

Pour nos électrophorèses sur papier, nous nous sommes servis de l'appareil de Machebœuf et Rebeyrotte (39). Nous avons utilisé les papiers Whatman n° 2 et Arches n° 301. Nous avons coloré les protéines avec le bleu de bromophénol en solution à 10 % dans de l'éthanol saturé de Cl_2Hg , les lipides avec une solution du noir de cérol saturée à chaud, puis refroidie et filtrée.

A l'électrophorèse sur papier, nous avons obtenu la meilleure résolution dans un tampon phosphate à pH 5,9 (fig. 4). A ce pH on distingue nettement sur le papier 3 fractions différentes. Dans le tampon véronal classique à pH 8,6 la séparation est moins bonne, on voit une seule fraction assez étalée, précédée et suivie de traînées assez floues. L'intérêt des électrophorèses à pH 8,6 réside dans la comparaison entre l'extrait pancréatique et les fractions sériques. En faisant migrer côte à côte sur la même bande de papier du sérum humain et l'extrait vagotonisant, la tâche principale de ce dernier se place au niveau des globulines β_2 du sérum humain.

Des électrophorèses réalisées avec une forte concentration en protéines (0,05 à 0,5 mg par expérience) devaient servir à mettre en évidence la présence de lipoprotéines dans l'extrait pancréatique après coloration au noir cérol. Ayant répété ces expériences plusieurs fois, nous n'avons jamais obtenu de coloration sur la piste de l'extrait pancréatique.

L'analyse électrophorétique de l'extrait pancréatique vagotonisant nous montre que cet extrait contient au moins 4 constituants globuliniques différents, que la fraction principale de cet extrait migre sur le papier avec la vitesse

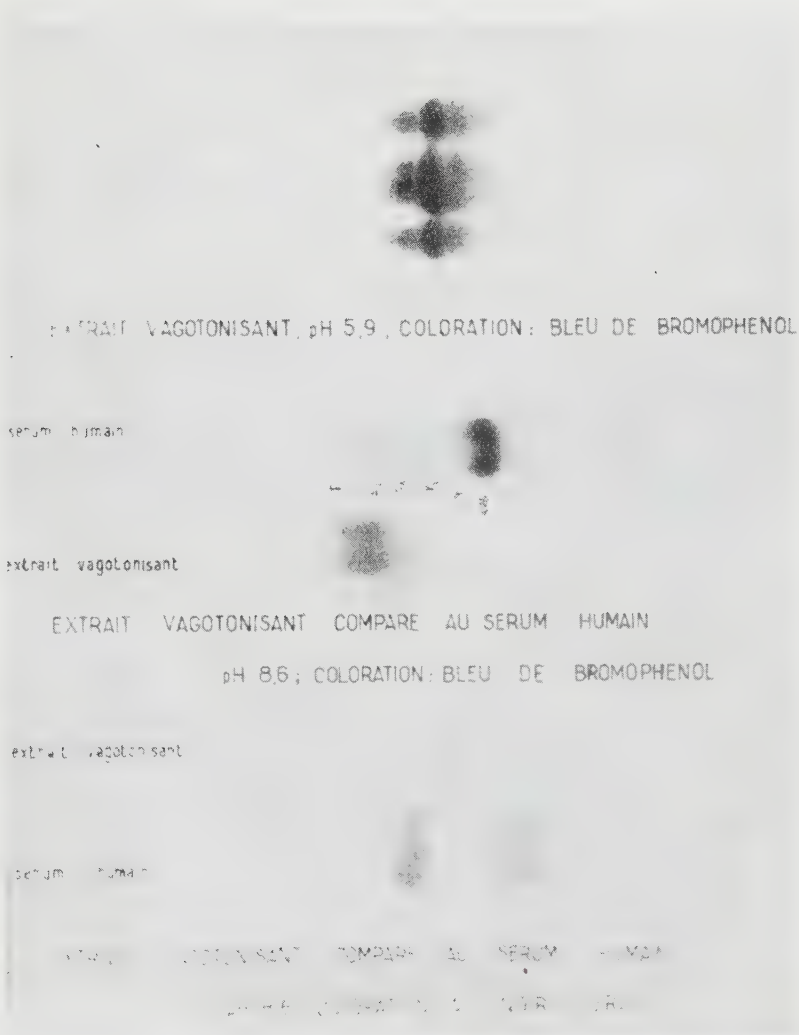


FIG. 4: Electrophorèse sur papier de l'extrait vagotonisant.

des globulines β_2 sériques, que l'extrait ne prend pas le colorant des lipo-protéines, et il n'apparaît pas de pic migrant avec la mobilité élevée de l'insuline. Enfin nous avons trouvé que l'augmentation de l'activité pondérale de nos préparations ne s'accompagne pas de l'accroissement d'une des fractions présentes dans tous les extraits actifs.

Ultracentrifugation de l'extrait vagotonisant

Depuis que SVEDBERG a mis au point la technique et la théorie de l'ultracentrifugation, cette méthode a été largement utilisée dans l'étude des protéines (40).

Nous avons pu soumettre un échantillon d'extrait vagotonisant à l'ultracentrifugation analytique à la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C. N. R. S. (*).

En solution dans un tampon véronal à pH 8,6 à trois concentrations différentes (15, 10 et 5 mg/ml), centrifugé dans une ultracentrifugeuse Spinco pendant 120 mn à la vitesse de rotation de 59 780 t/mn, l'extrait pancréatique sédimente sans se dissocier en plusieurs constituants (fig. 5). Ceci indique que les constituants de l'extrait ont des vitesses de sédimentation identiques. Le coefficient de sédimentation de l'extrait vagotonisant est de 1,8 unités Svedberg.

Ces résultats s'accordent bien avec ceux obtenus par G. MICHEL sur un autre extrait vagotonisant et ses fractions (38).

Extraction et dosage gravimétrique des lipides

Il a été observé au cours de la préparation des extraits vagotonisants que les dialyses à la température du laboratoire (18-20° C) donnent de meilleurs résultats que les dialyses effectuées à la chambre froide (4° C).

Ayant réalisé des fractionnements de sérum de chien, nous avons pu localiser une substance active sur le réflexe oculo-cardiaque dans la fraction β_2 riche en lipoprotéines.

Ces observations nous ont amené à rechercher des substances lipidiques dans l'extrait vagotonisant.

Nous avons placé 100 mg d'extrait vagotonisant dans une cartouche Durieux en pâte de cellulose sans graisse allant avec un appareil de micro-Kuma-Gawa dans lequel nous avons réalisé l'extraction des matières lipidiques à l'aide de trois solvants différents. La première extraction de 8 heures était effectuée avec 20 ml d'alcool absolu, la deuxième de 8 heures également avec 20ml d'éther, la troisième de 10 heures avec 20 ml de méthylal. Les solvants

(*) Nous remercions la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C. N. R. S. d'avoir bien voulu réaliser ces expériences.

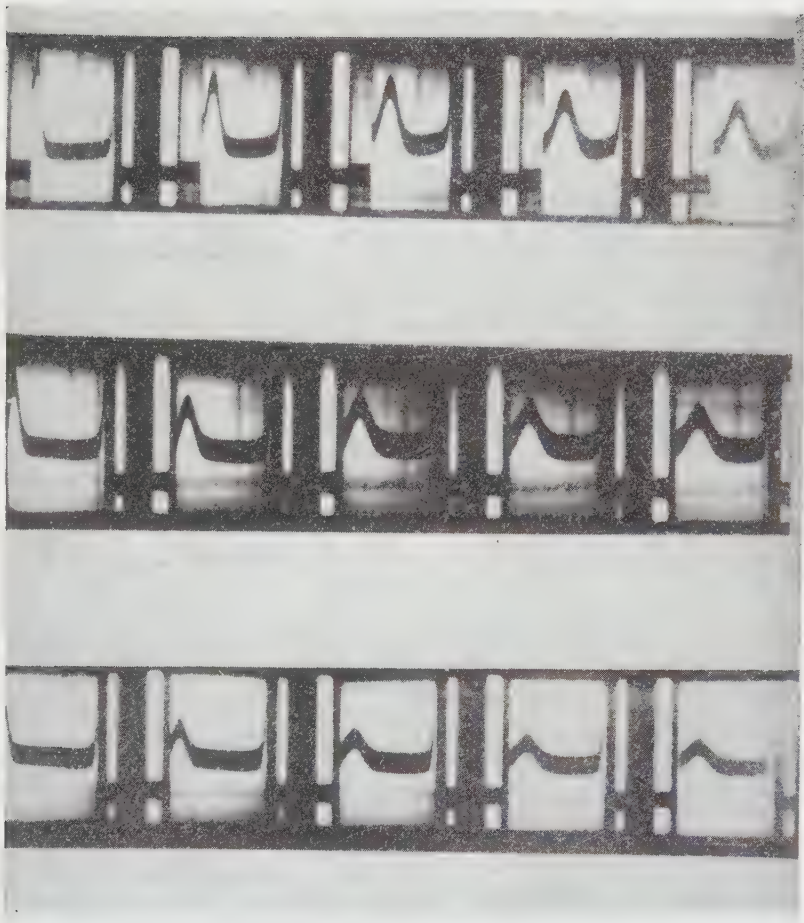


FIG. 5: Ultracentrifugation analytique de l'extrait pancréatique vagotonisant.

ayant été évaporés successivement d'un bécher, le résidu repris trois fois avec 5 ml d'éther, trois fois avec 5 ml de méthylal. Cette fois-ci les solvants ont été évaporés d'un bécher taré et le résidu obtenu a été séché à poids constant. Les trois dernières pesées effectuées à 24 heures d'intervalle ont donné le poids de 5,02 mg de lipides extracitibles pour 100 mg d'extrait.

Cette quantité de lipides n'est nullement négligeable et permet d'envisager l'éventualité de la présence d'une fraction lipoprotidique dans l'extrait vagotonisant. Il est

à noter toutefois, qu'à l'électrophorèse sur papier de l'extrait vagotonisant, la coloration au noir Cérol n'a pas montré de tache lipo-protidique. Il faudrait donc supposer que s'il y a une fraction lipoprotidique, elle est masquée dans un complexe et ce n'est que la dénaturation par les solvants organiques à leur point d'ébullition qui est capable de libérer ces substances lipidiques.

Chromatographie des acides aminés

Bien que l'extrait pancréatique vagotonisant se soit révélé hétérogène à l'électrophorèse et à la précipitation fractionnée, nous avons quand même entrepris la détermination des acides aminés qui se trouvent dans l'extrait. On sait qu'un nombre très limité d'acides aminés composent les extraits protidiques biologiques (20 à 28 environ) et comme tous ne sont pas forcément présents même dans un produit complexe, l'analyse qualitative des acides aminés nous a paru tout de même utile.

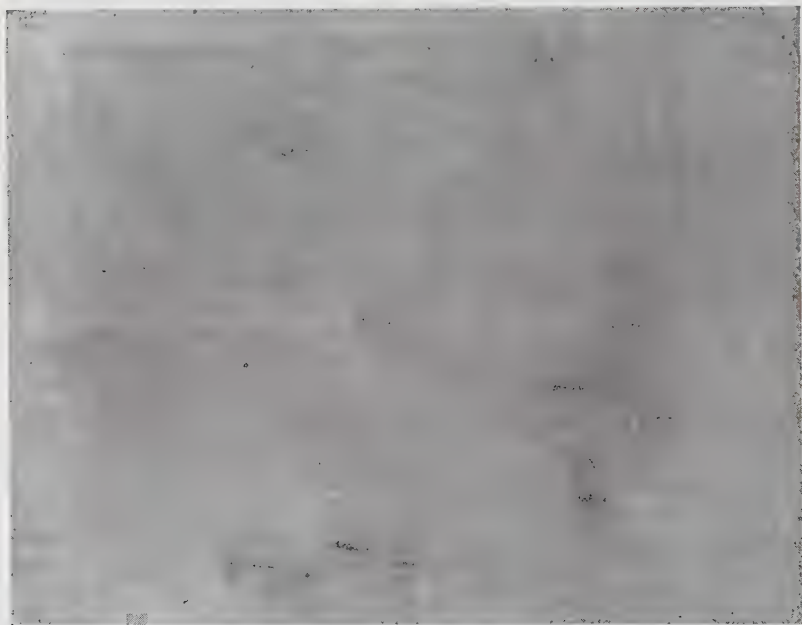


FIG. 6 : Chromatographie bidimensionnelle d'un hydrolysant acide d'un extrait pancréatique vagotonisant.



FIG. 7: Chromatographie descendante des dérivés dinitrophénolés de l'hydrolysat acide d'un extrait pancréatique.

Nous avons utilisé la technique de chromatographie de partage sur papier. Nous avons hydrolysé un échantillon de l'extrait vagotonisant pendant 24 heures dans de l'acide chlorydrique à 100° C. L'hydrolysat a été neutralisé avec de la soude et déposé sur du papier Whatman n° 4. Nous avons fait une chromatographie descendante à deux dimensions. Le temps de développement était de 12 heures environ dans chaque direction. Dans la première dimension nous avons utilisé comme solvant un mélange de trois parties de butanol pour une partie d'acide acétique, dans la deuxième un tampon phosphate à pH 7. Sur le papier séché, après révélation avec la ninhydrine, nous avons pu identifier les 12 acides aminés suivants : alanine, ac. aspartique, cystéine, ac. glutamique, glycine, hydroxyproline, leucine, lysine, proline, sérine, thréonine et valine (fig. 6).

En ajoutant à une partie de l'hydrolysat une solution à 1 % de dinitrophénol, nous avons obtenu sur une chromatographie descendante à une dimension les dérivés dinitrophénolés de l'arginine et de l'histidine (fig. 7).

Nous avons donc pu identifier jusqu'à présent 14 acides aminés dans l'hydrolysat de l'extrait vagotonisant, ce qui représente environ les deux tiers des acides aminés naturels les plus fréquemment observés.

Nous pousserons ces analyses plus loin après avoir isolé le principe actif de l'extrait vagotonisant des impuretés qui l'accompagnent encore.

Les résultats de ces quelques analyses physicochimiques montrent que l'extrait pancréatique vagotonisant même très purifié et physiologiquement actif à très faibles doses reste chimiquement hétérogène. L'extrait au stade final de sa purification se compose de quatre constituants différents et contient 5 % de substances lipidiques. Dans un hydrolysat acide de l'extrait on a pu identifier 14 acides aminés différents.

II. — ETUDE STATISTIQUE DU TITRAGE DE L'EXTRAIT VAGOTONISANT ET NOUVELLE DEFINITION DE L'UNITE VAGOTONISANTE

La principale action des extraits pancréatiques à action vagotonisante s'exerce sur le système nerveux végétatif. Parmi les effets exercés sur le système nerveux végétatif les

plus caractéristiques sont l'augmentation des effets réflexes vagues. Il était donc normal de baser sur le renforcement d'un réflexe le test qui doit servir à évaluer l'activité spécifique d'un extrait pancréatique.

Le réflexe le plus commode à pratiquer sur un animal intact est le réflexe oculocardiaque, qui se déclenche par compression des globes oculaires et entraîne pendant cette compression chez les sujets vagotoniques un arrêt ou un ralentissement notable des battements du cœur. Nous n'utilisons pas d'appareil compresseur dans nos tests, mais nous prenons la précaution d'appuyer suffisamment fort pour produire un effet maximum de cardio-modération. La durée de la compression est de 30 secondes environ, mais dans le cas d'une réponse fortement positive on peut se contenter de 15 à 20 secondes. On ne tient compte que des variations du rythme cardiaque qui surviennent pendant la durée même de la compression. Nous observons ces variations dans les tests pratiqués sur le lapin non anesthésié par palpation de la région précordiale d'un animal maintenu en décubitus latéral gauche. Le test est positif si la compression entraîne un arrêt ou un ralentissement considérable des battements du cœur. Par contre le test est nul quand la compression oculaire ne modifie pas le rythme cardiaque. Nous pratiquons les réflexes oculocardiaques sur le lapin mâle ou femelle, d'un poids de 3 kg environ, présentant spontanément un réflexe oculocardiaque nul.

Les avantages de ce test sont évidents : le résultat est obtenu en quelques heures, l'absence d'anesthésie élimine certaines difficultés d'interprétation, l'absence de traumatisme permet d'utiliser plusieurs fois le même animal.

Mais il y a également quelques inconvénients : tout le monde n'est pas d'accord sur les voies qu'emprunte ce réflexe (qui serait dans les fibres sensibles du trijumeau et les parasympathiques ralentisseurs du cœur). Et surtout, ce réflexe peut changer spontanément chez le même animal dans un laps de temps suffisamment court pour pouvoir fausser le résultats d'un test.

Dans ces conditions, nous avons trouvé essentiel de vérifier mathématiquement la reproductibilité du test et de déterminer les conditions dans lesquelles il convient de se placer afin d'obtenir le résultat de nos titrages avec un degré de sécurité satisfaisant.

Dans ce but nous avons fait tout d'abord une série d'ex-

périences de contrôle sur un lot de 44 lapins témoins et nous avons comparé les résultats de ces tests avec ceux obtenus sur un lot de 54 lapins ayant reçu un extrait pancréatique actif.

Les 44 lapins au réflexe oculocardiaque nul, utilisés pour les expériences de contrôle, maintenus dans le laboratoire dans les mêmes conditions que les animaux utilisés pour le titrage de substances actives ont reçu une injection sous-cutanée de sérum physiologique à la place d'extrait pancréatique. Les réflexes oculocardiaques ont été contrôlés une heure, deux heures et trois heures après l'injection du sérum physiologique. Selon une ancienne définition (41) l'unité vagotonisante est la plus petite quantité d'extrait pancréatique nécessaire pour obtenir une augmentation nette de l'excitabilité réflexe vagale durant deux heures chez le lapin non anesthésié. Nous avons donc basé nos calculs sur les lectures de la deuxième heure : 9 animaux sur 44 ont présenté à la deuxième heure un réflexe oculocardiaque positif.

Ces chiffres doivent être comparés à ceux obtenus sur 54 lapins ayant reçu un extrait pancréatique actif. Après s'être assurés, comme dans la série précédente, que les lapins présentaient avant l'injection de produit actif un réflexe oculocardiaque nul, nous pratiquons le test une heure, deux heures et trois heures après injection de l'extrait vagotonisant. Nous avons obtenu dans cette série 43 réponses positives à la deuxième heure.

Nous avons effectué la comparaison de ces deux séries d'expériences avec une méthode statistique, notamment avec un test de comparaison de deux moyennes, pour savoir

TABEAU III

	Nombre de lapins	Nombre de tests positifs à la 2 ^e h.	Nombre de tests nuls à la 2 ^e h.	Moyen- ne	Varian- ce	Ecart type.
Lapins ayant reçu du sérum physiologique.	44	9	35	0,204	0,162	0,403
Lapins ayant reçu l'extrait vagotonisant.	54	43	11	0,796	0,162	0,403

Etude des variations du réflexe oculo-cardiaque chez le lapin après injection de sérum physiologique ou extrait pancréatique vagotonisant.

s'il existe une différence significative entre les deux séries d'expériences (42).

Afin de pouvoir effectuer les calculs statistiques, nous avons dû donner une valeur numérique à nos lectures. La valeur zéro a été attribuée à chaque test nul et la valeur de 1 à chaque test positif.

Le tableau III résume les résultats des tests pratiqués sur les 44 lapins témoins et les 54 lapins ayant reçu l'extrait vagotonisant, ainsi que les valeurs caractéristiques calculées pour ces deux séries de tests.

Nous avons comparé ces deux moyennes à l'aide d'un test basé sur le critère de l'erreur standard de deux séries d'expériences calculée selon la formule suivante :

$$\sigma_{e^2} = \frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}$$

σ_1^2 et σ_2^2 représentent les variances des deux séries d'expériences, n_1 et n_2 le nombre d'animaux utilisés. La racine carrée du chiffre ainsi obtenu est l'erreur standard de la différence des deux moyennes. Si la différence des deux moyennes est supérieure au triple de l'erreur standard ainsi calculée, la différence entre les deux séries d'expériences est significative avec un degré de sécurité de 99 %.

Dans nos expériences effectuées sur des lapins ayant reçu soit du sérum physiologique, soit de l'extrait pancréatique actif, la différence des deux moyennes est environ sept fois supérieure à l'erreur standard, cette différence est donc hautement significative.

Nous avons également déterminé pour ces mêmes expériences les intervalles de sécurité selon la formule :

$$m \pm t \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

où m est la moyenne, σ l'écart type, n le nombre d'animaux utilisés, t le coefficient de risques, 2,58 dans nos calculs, de manière à obtenir le résultat avec un degré de sécurité de 99 %. Pour la série d'expériences témoins nous avons trouvé pour l'intervalle de sécurité $0,204 \pm 0,15$. Elle s'étend donc de 0,054 à 0,354. Pour la deuxième série de réflexes, nous avons obtenu $0,796 \pm 0,14$ avec comme

limites 0,656 et 0,936. Les deux intervalles de sécurité sont donc nettement séparés avec un degré de sécurité de 99 %.

Le principal intérêt de ces calculs réside dans la démonstration mathématique de la valeur du réflexe oculo-cardiaque en tant que test. Dans le calcul des intervalles de sécurité nous avons adopté un degré de sécurité très élevé, bien que dans ce genre de calculs on se contente généralement d'un degré de sécurité de 95 %. Etant donné que même dans ces conditions sévères les deux intervalles sont nettement séparés, il est évident, que la pratique du réflexe oculo-cardiaque dans nos conditions expérimentales permet de différencier une substance active sur le para-sympathique d'une solution inactive. Par conséquent l'utilisation de ce test pour le titrage d'extraits pancréatiques est pleinement justifiée.

Il est impossible de pratiquer les titrages de routine sur un grand nombre de lapins. Nous avons fixé à 8 le nombre d'animaux utilisés pour l'étude de l'activité d'un extrait pancréatique.

Sur un lot réduit de 8 animaux, les variations spontanées du test sont relativement plus importantes que sur un grand nombre de lapins, nous avons donc demandé aux méthodes statistiques de nous indiquer le nombre minimum de réponses positives à exiger pour obtenir sur un lot de 8 lapins un résultat significatif avec un degré de sécurité de 95 %.

Nous avons tout d'abord déterminé les limites des variations spontanées sur un lot de 8 animaux avec le degré de sécurité choisi. Ensuite, nous avons pris en considération les deux hypothèses suivantes : d'abord celle d'un titrage ayant donné 5 tests positifs sur 8 animaux mis en expérience, puis celle d'un titrage conduisant à 6 tests positifs sur 8 animaux. Pour chacun de ces cas nous avons calculé la moyenne, la variance et l'intervalle de sécurité selon la formule valable pour un lot réduit :

$$\bar{m} \pm t \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

où $\bar{m}$ est la moyenne, σ l'écart type, n le nombre d'animaux utilisés, t le coefficient de risques, qui est de 2,36 pour un lot de 8 animaux et un degré de sécurité de 95 %.

En faisant les calculs avec les valeurs caractéristiques indiquées dans le tableau III, nous obtenons pour les

témoins $0,204 \pm 0,143$. L'intervalle de sécurité va donc de 0,061 à 0,347.

Prenons maintenant le cas de 6 tests positifs à la deuxième heure : ceci donne les valeurs caractéristiques suivantes :

$$n = 8; \quad \overline{m} = 0,750; \quad v = 0,186; \quad \sigma = 0,432$$

Ces valeurs nous permettent de calculer pour l'intervalle de sécurité $0,750 \pm 0,382$.

L'intervalle de sécurité s'étend dans ce cas de 0,368 à 1,132. Par conséquent, avec 6 réflexes oculo-cardiaques positifs à la deuxième heure, le résultat du titrage est positif avec un degré de sécurité de 95 %.

Pour 5 tests positifs sur 8, les intervalles de sécurité des témoins et des animaux testés se couvrent partiellement, 5 tests positifs sur 8 ne donnent pas un résultat significatif avec un degré de sécurité satisfaisant. C'est seulement à partir de 6 tests positifs sur 8 que nous pouvons attribuer à la substance étudiée et à la dose utilisée un effet significatif sur le réflexe oculo-cardiaque. Cette notion prend toute son importance dans la recherche du seuil d'action d'une substance, qui est le but même du titrage d'un extrait pancréatique purifié.

A la lumière de cette étude quantitative du titrage, nous pouvons apporter une précision supplémentaire à la définition de l'unité vagotonisante proposée en 1950 par D. SANTENOISE, M. POLONOVSKI et Th. SANTENOISE (41), en prenant comme unité la plus petite quantité d'extrait pancréatique injectée à 1 kg de lapin, qui sur un lot de huit lapins au réflexe oculo-cardiaque nul au départ est capable de produire deux heures après injection au moins six réflexes oculo-cardiaques positifs.

III. — MISE EN EVIDENCE DANS LES PROTEINES DU SERUM DE CHIEN D'UNE SUBSTANCE ACTIVE SUR LE REFLEXE OCULO-CARDIAQUE

D. SANTENOISE et ses collaborateurs ont montré que la pancréatectomie est suivie chez le chien d'une diminution de l'excitabilité vagale qui se traduit par la négativation du réflexe oculo-cardiaque positif au préalable (5). La transfusion au chien dépancraté du sang d'un chien

intact rétablit temporairement l'excitabilité vagale, rendant le réflexe oculo-cardiaque de nouveau positif. Cette action sur l'excitabilité réflexe parasympathique n'est pas liée aux globules rouges, étant donné que l'injection de globules rouges lavés n'a pas d'action sur le réflexe oculo-cardiaque. Par contre, l'injection de sérum défibriné et centrifugé produit la même action sur ce réflexe que l'injection de la quantité de sang totale correspondante. Ces expériences indiquent la présence dans le sérum du sang circulant d'une substance douée d'activité biologique analogue à celle de la vagotonine extraite des protéines pancréatiques. Comme au cours de ces dernières années, grâce à des méthodes de fractionnement plus perfectionnées, un grand nombre de substances biologiquement actives ont pu être localisées dans les protéines sériques, nous avons cherché à identifier la partie du sérum à laquelle on peut attribuer l'action sur l'excitabilité réflexe parasympathique.

Nous avons fractionné le sérum de six chiens selon une technique mise au point par M. MACHEBŒUF et ses collaborateurs (43). Le principe de cette méthode repose sur le fait qu'une concentration de 30 % en méthanol au pH du sérum précipite les globulines γ avec un peu de globulines β_2 . Une légère acidification amène la précipitation des globulines β et α . Le surnageant contient les albumines. Nous avons travaillé avec du sérum et des réactifs refroidis à la chambre froide et amenés à -2°C à l'aide d'un mélange de glace et de sel. Ayant ajouté à deux parties du sérum une partie d'un tampon acétate et sept parties d'un mélange aqueux de méthanol, au bout de 30 mn on recueille par centrifugation les globulines γ et β_2 . on acidifie le surnageant par addition d'acide acétique, on attend encore une demi-heure et on centrifuge les globulines β et α . Les albumines sont finalement précipitées par addition à la solution d'un volume égal de méthanol pur. Les précipités sont séchés sous vide, pulvérisés et pesés. Nous avons obtenu environ 6 grammes de protéines pour 100 ml de sérum. Pour 1 g de la première fraction (globulines γ - β_2) il y avait environ 1,20 g de la deuxième (globulines α et β) et 1,60 g de la troisième fraction (albumine).

Nous avons contrôlé les fractions obtenues à l'électrophorèse sur papier et nous avons vu que seule la première fraction était obtenue nettement séparée. Pour la deuxième fraction, outre les globulines β_1 , α_1 et α_2 on observe une faible tache au niveau des globulines β_2 et les albumines contiennent des traces de globulines α_1 et α_2 . La coloration

par le noir Soudan montre que les trois fractions contiennent des lipoprotéines.

Nous avons contrôlé l'action de chacune des fractions obtenues sur l'excitabilité réflexe parasympathique de lapins anesthésiés par injection intrapéritonale d'uréthane à la dose de 1 g/kg et surtout des chiens en anesthésie limite continue au chloralose. Cette dernière technique d'anesthésie, mise au point dans le laboratoire du Professeur SANTENOISE (44), consiste à anesthésier le chien par perfusion continue d'une quantité de chloralose juste suffisante pour maintenir chez l'animal une anesthésie limite caractérisée par la réapparition de la sensibilité douloureuse profonde. Cette dernière se manifeste en particulier par des réactions motrices et respiratoires provoquées par la flexion forcée du métacarpe sur l'avant-bras du chien (signe de la patte). Avec cette anesthésie, qui peut être maintenue stable pendant toute la durée de l'expérience, les centres nerveux ne sont presque pas déprimés et le réflexe oculo-cardiaque peut être observé dans de très bonnes conditions.

Nous avons contrôlé la température rectale des animaux que nous avons maintenue constante à l'aide d'un appareil de Miramon. Nous avons pratiqué une trachéotomie et mis en place une canule trachéale destinée à assurer une bonne ventilation. Une canule de Franck liée dans la carotide droite des chiens et reliée à un mano-

TABLEAU IV

N° du fractionnement	Action sur le réflexe oculo-cardiaque		
	Fraction I ($\gamma - \beta_2$)	Fraction II ($\alpha_1 - \alpha_2 - \beta_1$)	Fraction III Albumines.
1	+	0	0
2	+	+	0
3	±	0	0
4	+	0	0
5	+	0	0
6	+	0	0
+ = résultat positif ; 0 = résultat nul ; ± = résultat douteux			

Action sur le réflexe oculo-cardiaque des 3 fractions du sérum de chien.

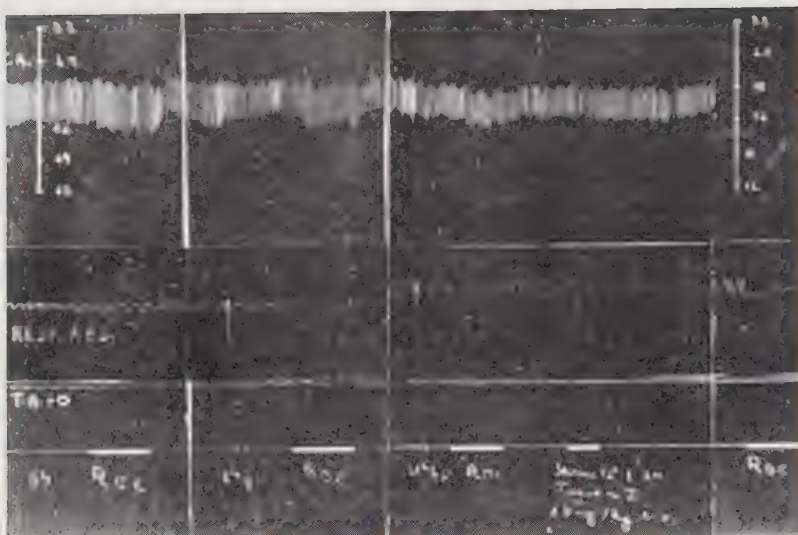


FIG. 8: ROC d'un chien avant et après injection de la 1^{re} fraction du sérum de chien.

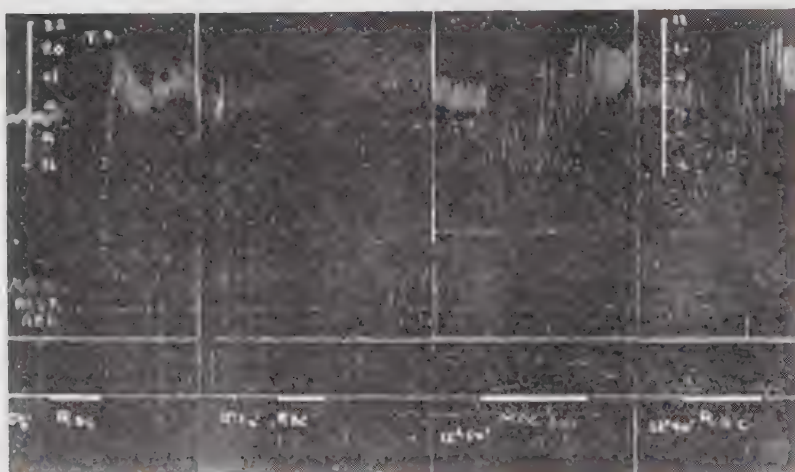


FIG. 8 (suite)

mètre à mercure de Ludwig nous a permis d'enregistrer les battements cardiaques. Nous avons conclu à une action

vagotonisante de la fraction sérique administrée à la dose de 20 mg/kg par une canule de Verdin placée dans la veine saphène, lorsqu'une même compression des globes oculaires qui avant injection n'avait pas ralenti notablement le rythme cardiaque, déclenchait environ un quart d'heure après administration de protéines sériques et pendant au moins une heure un fort ralentissement ou un arrêt momentané du cœur.

Nous avons réuni dans le tableau IV les résultats obtenus sur les animaux anesthésiés. La fig. 8 montre les réflexes oculo-cardiaques d'un chien avant et après injection d'une fraction globulinique γ - β_2 du sérum du chien.

Les résultats obtenus ont montré que ni les deuxièmes fractions, ni les troisièmes fractions n'agissent sur le réflexe oculo-cardiaque. Par contre ce dernier a été considérablement renforcé dans cinq cas sur six par la première fraction contenant les globulines γ - β_2 . Dans le sixième cas le résultat était douteux.

Nous avons voulu vérifier ces résultats avec la méthode de titrage habituelle des extraits vagotonisants. Nous avons administré à cet effet 15 mg/kg des trois fractions sériques à des lapins non anesthésiés présentant spontanément un réflexe oculo-cardiaque nul. Le tableau V montre les réflexes observés 1 heure, deux heures, et trois heures après injection intrapéritonéale des fractions sériques. Chez le lapin non anesthésié c'est encore la première fraction qui se montre active, les deux autres n'influencent pas le réflexe oculo-cardiaque.

La substance sérique capable de reproduire l'action des extraits pancréatiques vagotonisants sur le réflexe oculo-cardiaque se trouve donc localisée dans les globulines γ - β_2 . Il est intéressant à noter, qu'à l'électrophorèse en veine liquide, la vitesse de migration des fractions communes à toutes les préparations vagotonisantes est de même ordre, que celle des globulines β sériques. En outre, la fraction la plus abondante a une vitesse de migration de 2,9-3,1, ce qui correspond dans le sérum aux globulines β_2 .

Dans nos travaux ultérieurs nous chercherons à mettre en évidence cette action sur le réflexe oculo-cardiaque dans le sérum humain et en cas de résultats positifs nous nous efforcerons de serrer de plus près la fraction responsable de cette action grâce à des méthodes de fractionnement très perfectionnées qui ont été élaborées pour le sérum humain.

TABLEAU V

Fraction I Globulines γ - β_2 .

n°	Poids Kg	Réflexe oculo-cardiaque			n°	Poids Kg	Réflexe oculo-cardiaque		
		1 ^h h.	2 ^h h.	3 ^h h.			1 ^h h.	2 ^h h.	3 ^h h.
1	3,30	+	+	0	5	3,20	+	+	+
2	3,00	+	+	+	6	3,10	0	0	±
3	3,60	0	±	0	7	3,30	+	+	+
4	3,20	+	+	+	8	3,30	0	+	+

Fraction II Globulines α_1 , α_2 , β_1 .

n°	Poids Kg	Réflexe oculo-cardiaque			n°	Poids Kg	Réflexe oculo-cardiaque		
		1 ^h h.	2 ^h h.	3 ^h h.			1 ^h h.	2 ^h h.	3 ^h h.
1	3,40	0	0	0	5	3,20	0	0	0
2	3,40	0	0	0	6	3,40	0	±	0
3	3,70	+	+	0	7	3,00	0	0	0
4	3,00	0	0	0	8	3,30	0	0	0

Fraction III Albumines.

n°	Poids Kg	Réflexe oculo-cardiaque			n°	Poids Kg	Réflexe oculo-cardiaque		
		1 ^h h.	2 ^h h.	3 ^h h.			1 ^h h.	2 ^h h.	3 ^h h.
1	2,10	+	+	+	5	2,80	0	0	0
2	2,90	+	0	0	6	3,00	0	±	±
3	3,30	0	0	0	7	3,20	0	0	0
4	2,20	0	0	0	8	3,20	+	+	0

Action sur le réflexe oculo-cardiaque des 3 fractions sériques chez le lapin non-anesthésié.

IV. — ACTION HYPOGLYCEMIANTE DES EXTRAITS PANCREATIQUES VAGOTONISANTS

Il est apparu depuis longtemps que l'injection de l'extrait vagotonisant est suivie d'une baisse de la glycémie. La préparation de la vagotonine comporte plusieurs précipitations de l'insuline au point isoélectrique de cette dernière, ainsi qu'une précipitation par le ferrocyanure de

potassium qui entraîne l'insuline sous forme de complexe. L'électrophorèse en veine liquide d'une solution de vagotonine ne montre pas de pic migrant avec la mobilité de l'insuline. On pouvait donc se demander à quoi il faut attribuer la baisse de glycémie consécutive à l'injection des extraits vagotonisants, d'autant plus qu'une action hypoglycémiant propre à la vagotonine a été un moment envisagée. D'ailleurs l'exemple des seuls sulfamides hypoglycémians suffit pour prouver qu'une hypoglycémie intense et durable peut être déclanchée par une substance autre que l'insuline.

Nous avons donc repris l'étude de ce problème avec un extrait soigneusement purifié (vagotonine 16 NF), actif sur le réflexe oculo-cardiaque des lapins à la dose de 0,01 mg/kg, pour voir si l'action hypoglycémiant de l'extrait vagotonisant se distingue de celle de l'insuline.

Dans une première série d'expériences, nous avons injecté l'extrait vagotonisant en solution dans du sérum

TABLEAU VI

Aktion de l'extrait pancréatique vagotonisant 16 NF
sur la glycémie du Rat. Dose : 5 mg / rat de 100 g
(50 mg/kg) en injection intrapéritonéale.

Nu- mé- ro	Nombre d'ani- maux	Glycémie en mg %		Abaissement en %
		Témoins	1h30-2h après	
1	22	61,0	36,2	39
2	11	73,4	55,0	67
3	14	61,0	36,0	57
4	10	90,5	69,0	41
5	11	77,5	35,0	74
6	11	73,0	39,6	41
7	8	100,0	31,0	72
8	8	97,0	41,7	57
9	6	78,0	61,0	21
10	6	86,0	71,0	17
11	6	114,0	85,0	30
12	6	111,0	119,0	0
13	6	110,0	42,0	62
Nombre total de rats 125				
Moyennes		87,1	53,9	44,4

physiologique à des doses de 1 à 50 mg/kg en injection intrapéritonéale à des rats blancs des deux sexes, à jeûn de 12 heures à 24 heures avant le début des expériences. Les rats ont été décapités de 30 mn à 6 heures après l'in-

jection de l'extrait vagotonisant, ou du sérum physiologique à des témoins. Nous avons dosé la glycémie sur 0,1 ml de sang total avec la microméthode de Hagedorn et Jensen (45). Les dosages du glycogène selon PFLUGER (46) ont été faits sur le foie entier. Après excision et pesée, le foie entier du rat est placé dans une solution de potasse à 60 % au bain-marie bouillant. En 3-4 heures la décomposition des tissus est totale. On enlève alors les tubes du bain-marie, on refroidit la solution et on précipite le glycogène avec de l'éthanol à 96°. Les réducteurs du précipité redissout et neutralisé sont dosés selon la technique de Hagedorn et Jensen. Nos résultats sont exprimés en mg de glycogène par gramme de foie.

Un grand nombre de telles expériences, dont les résultats sont réunis dans le tableau IV, nous a permis de constater une action très nette de l'extrait pancréatique sur la glycémie des rats :

1) L'injection d'extrait vagotonisant est régulièrement suivie d'un abaissement considérable de la glycémie, pouvant dépasser 50 % pour les doses très élevées (50 mg/kg).

2) L'hypoglycémie observée augmente proportionnellement avec la dose d'extrait injectée (fig. 9). On constate que les glycémies des animaux ayant reçu 10 mg/kg d'extrait pancréatique ou des doses encore plus faibles, se confondent avec celles des témoins. Avec 15 mg/kg il y a déjà une légère baisse, 20 et 30 mg/kg donnent des courbes superposables, avec 40 mg/kg la baisse de glycémie dépasse 40 %.

L'étude des variations du glycogène hépatique ne nous conduit pas à des conclusions aussi nettes. Avec des doses de 1 à 40 mg/kg nous n'avons obtenu aucune variation notable. Avec 50 mg/kg on observe une baisse du glycogène dans environ un tiers des cas, dans les deux tiers restants il n'y a pas de variation significative du glycogène hépatique.

Il peut paraître étonnant, *a priori*, que des variations importantes de la glycémie puissent avoir lieu sans répercussion sur le taux des réserves de glycogène du foie. Cependant nous pouvons mentionner les travaux d'AGID

FIG. 9.

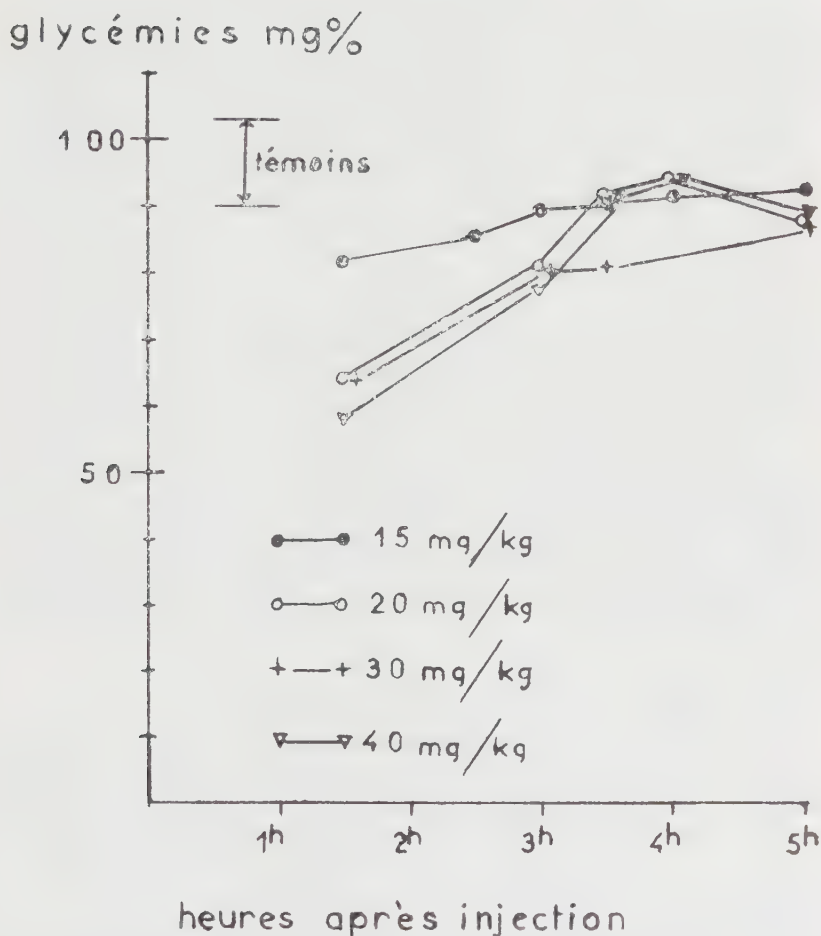


FIG. 9: Glycémies des lapins ayant reçu une injection d'extrait vagotonisant.

et MIALHE qui ont mis en évidence l'existence dans le foie du glucose libre en plus du glycogène (46). Selon ces auteurs, ce glucose libre existe dans le foie en quantité comparable au glycogène, et en cas de besoin ce glucose libre serait le premier mobilisé, ce qui amène ces auteurs à considérer le glucose libre comme intermédiaire entre le glycogène hépatique et les sucres du sang. D'autre part les travaux de Th. CAHN sur l'influence du jeûne sur la teneur

en glucides de l'organisme mettent en évidence une très importante néoformation du glucose dans l'organisme d'un animal jeûneur (47). Cette néoglycogénèse se ferait surtout à partir des réserves lipidiques, mais également à partir des protéines, sous l'action des hormones catabolisantes de la surrénale, les glucocorticoïdes (48). Nous ne pouvons pas entrer dans les détails du métabolisme des glucides nous nous contentons de constater que la relative stabilité du glycogène hépatique notée au cours de nos expériences n'est pas en contradiction avec les résultats obtenus par les spécialistes du métabolisme glucidique.

Des expériences de contrôle avec de l'insuline ont donné des taux de glycémie et de glycogène semblables à ceux observés avec la vagotonine. Par contre l'injection de l'extrait pancréatique à action respiratoire (centronéine) ne modifie ni le taux de glycémie, ni le glycogène hépatique.

Il nous a paru logique d'admettre que l'injection d'extrait vagotonisant provoque une baisse de glycémie et la baisse du glycogène hépatique quand elle a lieu, est secondaire et consécutive à la baisse de glycémie. Nous avons vérifié cette hypothèse sur un lot de rats surrénalectomisés et nous avons constaté que l'injection de 50 mg/kg de vagotonine provoque toujours une baisse de glycémie,

TABLEAU VII

Action de l'extrait vagotonisant sur la glycémie et le glycogène hépatique du Rat surrénalectomisé.

<u>1.- Animaux témoins (normaux)</u>	<u>Glycémie</u>	<u>Glycogène hématique</u>
30 mn après injection de 5 mg de vagotonine.	0,85 g/l	4,500 mg/100
60 mn	0,55	4,200
90 mn	0,60	1,500
180 mn	0,35	1,350
240 mn	0,70	1,600
<u>2.- Animaux surrénalectomisés.</u>		
30 mn après injection de 5 mg de vagotonine.	0,60	2,950
60 mn	0,30	3,220
90 mn mort par hypoglycémie.		4,010
180 mn	0,40	3,700
240 mn	0,40	4,200

mais le glycogène hépatique reste stable pendant toute la durée de l'expérience (4 heures) (tableau VII).

La durée d'action et l'allure des courbes d'hypoglycémie n'ont pas permis d'écarter la possibilité d'une action insuliniennne. Nous avons donc procédé à des expériences dont le but était de préciser la nature de l'action hypoglycémiant observée : est-elle imputable à des traces d'insuline restées dans la vagotonine ou peut-elle s'expliquer par une exaltation de l'activité de l'insuline endogène ou un autre mécanisme central s'exerçant par intermédiaire du pneumogastrique.

Dans ce but nous avons créé chez un lot de lapins un diabète permanent par injection unique d'alloxane. Nous avons suivi l'évolution de la glycémie en faisant trois fois par semaine une prise de sang dans la veine marginale de l'oreille et dosé la glycémie avec la micro-méthode de Hagedorn et Jensen. Chez la plupart des animaux nous avons observé une augmentation de la glycémie qui s'est ensuite maintenue à des valeurs très nettement pathologiques (200-350 mg %). A l'exception d'un petit lot de témoins les lapins diabétiques ont reçu une injection quotidienne de 5 mg/kg d'extrait vagotonisant. Ces injections sont régulièrement suivies de baisse de glycémie et parfois même de convulsions.

Un lot de six lapins en diabète alloxanique permanent a servi à confirmer cette action dans une expérience plus courte. Après une prise de sang témoin les lapins ont reçu une injection intraveineuse de 5 mg/kg d'extrait vagotonisant. Les glycémies ont été dosées entre 30 mn et 5 heures après l'injection. Chez tous les lapins nous avons constaté une baisse de glycémie prononcée (fig. 10).

Chez un animal à cellules β détruites l'extrait pancréatique ne peut pas agir en provoquant une sécrétion d'insuline, ni en augmentant l'activité de l'insuline endogène par action synergique. Donc l'extrait vagotonisant abaisse la glycémie même en absence d'insuline endogène.

L'action hypoglycémiant étant ainsi constatée, nous avons continué notre travail en nous basant sur l'hypothèse de travail suivante : le mode d'action de l'insuline est connu, il doit différer de celui de la vagotonine. L'action de l'insuline est périphérique et peut être observée sur le muscle isolé. Celle de la vagotonine doit s'exercer par intermédiaire du pneumogastrique. La vagotonine ne devrait

FIG. 10.

glycémies mg%

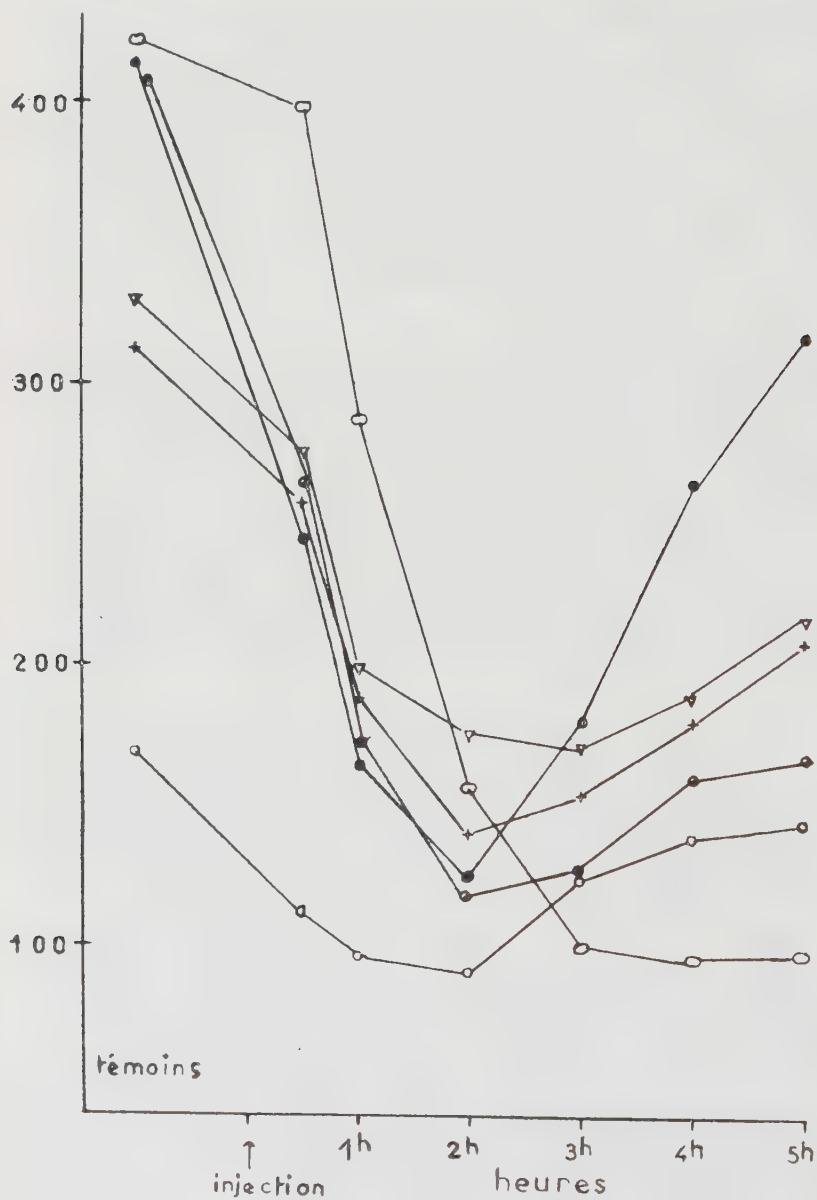


FIG. 10: Glycémies des lapins en diabète alloxanique ayant reçu une injection d'extrait vacotonisant.

donc avoir aucune action sur la synthèse du glycogène musculaire *in vitro*.

Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes basé sur le travail de STADIE et ses collaborateurs qui ont démontré que l'insuline ajoutée au glucose dans le liquide d'incubation augmente considérablement la synthèse du glycogène par le muscle. Dans une fiole contenant 5 ml d'un tampon composé de phosphate de sodium, de chlorure de magnésium et de chlorure de sodium, nous avons incubé 5 hémidiaphragmes enlevés à des rats blancs mâles de 100 g. Nous avons ajouté du glucose jusqu'à une concentration finale de 3 %. Une fiole servait de témoin, dans une autre nous avons ajouté 5 à 15 mg d'extrait vagotonisant, enfin dans une troisième 2 U.I. d'insuline. Les incubations ont été agitées sous O₂ pendant 2 heures à 37° C, puis nous avons arrêté la synthèse en ajoutant de la potasse à 60 % et procédé à des dosages de glycogène. Les chiffres obtenus traduisent une activation faible, mais régulière de la synthèse du glycogène sous l'influence de l'extrait vagotonisant (tableau VIII). Cette activation augmente proportionnellement à la dose employée

TABLEAU VIII

Action de l'extrait pancréatique vagotonisant
sur la synthèse du glycogène dans le diaphragme
du rat.

GLYCOGENE DES DIAPHRAGMES EN MG/G

	<u>Glucose seul.</u>	<u>Glucose + extrait vagotonisant 5 mg.</u>	<u>Synthèse due à l'ex- trait vagotonisant.</u>
1.	1,957	2,321	0,364
2.	0,556	0,870	0,314
3.	0,990	1,250	0,260
4.	2,650	3,250	0,600
5.	2,440	2,800	0,360

	<u>Glucose seul.</u>	<u>Glucose + insuline 2 U.I.</u>	<u>Synthèse due à l'insuline.</u>
1.	2,330	3,750	1,420
2.	0,750	1,980	1,230
3.	2,867	4,100	2,233
4.	3,210	4,230	1,020
5.	2,440	3,420	0,980

et on peut dire à titre de comparaison, qu'une dose de 15 mg d'extrait vagotonisant produit l'effet de 2 U.I. (42 γ) d'insuline sur la synthèse du glycogène (tableau IX). Notre extrait pancréatique favorise donc la synthèse du glycogène, tout comme l'insuline, bien qu'une action centrale soit exclue dans le cas du muscle isolé.

Si nous comparons nos résultats avec ceux publiés antérieurement (50), nous voyons que nos dosages chimiques sur le foie entier du rat n'ont pas permis de retrouver l'augmentation du glycogène hépatique constatée chez le chien à l'aide de coupes histologiques du foie. Nous pensons revenir sur ce problème dans un travail ultérieur. Par contre nous avons retrouvé l'action hypoglycémiante signalée et nous constatons qu'elle peut se produire en absence d'insuline endogène. Compte tenu de l'action sur le diaphragme isolé du rat nous croyons logique d'admettre

TABLEAU IX

Les résultats portent sur 36 rats. Glycogène exprimé en mg/g. de foie frais.

	<u>Extrait vagotonisant :</u>		<u>Insuline :</u>
	<u>5 mg</u>	<u>15 mg</u>	<u>2 U.I.</u>
Exp. n° 1	1,734	2.840	3.750
2	0.550	1.710	1.630
3	0.880	2.120	1.470
4	2.710	4.160	4.570
5	0.990	3.550	3.220
6	0.660	2.750	2.710
7	2.550	3.480	4.760
8	1.710	5.310	5.760
9	2.220	3.710	4.860
10	1.310	4.320	4.210
11	0.720	3.220	2.870
12	0.610	3.010	3.410
13	0.550	1.990	1.670
14	0.440	2.670	1.910
15	1.570	4.330	4.070
16	0.190	0.780	0.650
	-----	-----	-----
Moyennes	1.212	3.120	3.250

Action de l'insuline et de l'extrait pancréatique vagotonisant sur la synthèse du glycogène dans le diaphragme du rat.

qu'il reste des traces d'insuline dans l'extrait pancréatique à action vagotonisante. D'ailleurs nous savons depuis les travaux de SANGER (51) que la plus petite unité active de l'insuline est un polypeptide d'une masse moléculaire de 6 000 seulement. Une impureté pondéralement très peu importante est toujours difficile à éliminer d'un mélange protidique dont les constituants ont des propriétés physico-chimiques très voisines. Ce fait explique l'impossibilité d'éliminer ces faibles traces d'insuline par précipitation au ferrocyanure, ainsi que l'absence du pic insulinien de l'électrophorèse de l'extrait vagotonisant. On sait que l'électrophorèse ne montre que des fractions qui représentent 1 % au moins de la substance analysée.

Il est à noter que les doses de vagotonine provoquant une hypoglycémie sur l'animal intact, sont d'ailleurs bien plus fortes (15 mg/kg au moins), que celles qui provoquent l'effet physiologique classique de la vagotonine (0,01 à 5 mg/kg). La quantité d'insuline capable de provoquer les effets observés dans nos expériences ne dépasse pas 3 p. 1000 de la quantité de substance injectée.

V. — ETUDE DE L'ACTION DE L'EXTRAIT PANCREATIQUE A ACTION VAGOTONISANTE SUR LE MUSCLE LISSE ET LA PERMEABILITE CAPILLAIRE

Compte tenu des analogies entre certaines propriétés de l'extrait pancréatique vagotonisant et les substances dites « kinines », notamment en ce qui concerne leur nature protidique ainsi que leurs actions hypotensive et vasodilatatrice (1, 2), nous avons entrepris une étude destinée à déterminer si l'extrait vagotonisant contient en dehors de ses actions connues jusqu'à présent, d'autres activités biologiques semblables à celles des kinines.

Nous avons commencé par l'étude de l'action de l'extrait vagotonisant sur le muscle lisse. Les kinines exercent une action nette et intense sur plusieurs sortes de muscles lisses, en particulier sur l'iléon du cobaye. L'extrait pancréatique vagotonisant renforce *in vivo* les mouvements péristaltiques de l'intestin du chien et renforce également les battements du cœur isolé de la grenouille (7). Sur le muscle dorsal de la sangsue l'extrait vagotonisant n'a pas d'action directe, n'influence pas non plus la sensibilité du muscle à l'acéthylcholine, par contre, il diminue l'exaltation par l'ésérine de la sensibilité du

muscle à l'acétylcholine (12). Cette diminution de l'efficacité de l'ésérine, action apparemment paradoxale pour un stimulant du parasymphathique, a été observée également sur le muscle circulaire de l'iris avec le mintacol et la pilocarpine.

Nous avons étudié sur l'iléon et le duodénum isolés du cobaye l'action de deux préparations pancréatiques vagotonisantes. La première était un extrait presque brut, l'autre au contraire très purifiée et pondéralement active sur le réflexe oculo-cardiaque du lapin à la dose de 1/50 mg/kg. Les deux préparations faisaient se contracter les segments du duodénum et d'iléon de cobaye. Les doses minima efficaces étaient de 0,5 mg pour la préparation brute et de 0,25 mg pour la préparation purifiée pour un bain de Tyrode de 20 ml à 37° C. Rappelons que la bradykynine fait se contracter l'iléon du cobaye et se relâcher le duodénum de rat. Apparemment l'extrait n'a pas modifié la sensibilité du muscle à l'acétylcholine.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons étudié la variation de la perméabilité capillaire sous l'influence de l'extrait vagotonisant. On sait que les kinines et d'autres protides (leucotaxine) augmentent la perméabilité capillaire.

Nous avons travaillé sur le rat blanc anesthésié à l'uréthane, selon une technique de LIACOPOULOS et HALPERN (66). Cette technique consiste à injecter par voie intraveineuse 0,25 ml d'une solution de bleu d'Evans à 5 ‰, et administrer ensuite par voie intradermique dans la peau de l'abdomen, dans un volume de 0,05 ml de sérum physiologique des solutions d'histamine et de la substance à étudier à des concentrations variables. Les résultats s'observent à la surface interne de la peau abdominale. Une tache bleue de 6 à 8 mm de diamètre, représentant le trouble lininaire de la perméabilité capillaire, a été obtenue dans nos expériences avec 1 δ d'histamine pour les témoins, et avec l'extrait vagotonisant avec des doses de 2,5 à 5 γ selon les expériences.

Dans nos expériences nous avons pu mettre en évidence deux propriétés nouvelles de l'extrait vagotonisant : son action contracturante sur les muscles lisses et sa capacité d'augmenter la perméabilité capillaire.

VI. — DISCUSSION DES RESULTATS CONCERNANT L'EXTRAIT PANCREATIQUE VAGOTONISANT

Il résulte de nos travaux physico-chimiques, que tel qu'il est préparé actuellement, l'extrait pancréatique vagotonisant est encore chimiquement complexe. Il renferme au moins 4 constituants de mobilités électrophorétiques différentes. Il contient également des lipides extractibles en quantité non négligeable. La séparation de ces constituants est difficile du fait de la ressemblance de leurs propriétés physico-chimiques. Les masses moléculaires des composants de l'extrait sont apparemment pratiquement identiques.

La principale action de l'extrait vagotonisant s'exerce sur le système nerveux parasymphatique. La mesure de l'activité de l'extrait est basée précisément sur l'observation du réflexe oculo-cardiaque, qui reflète l'excitabilité parasymphatique. L'étude statistique du réflexe oculo-cardiaque chez le lapin non anesthésié a permis de prouver, qu'il est possible de titrer l'activité vagotonisante avec une très grande sécurité sur un lot de 8 lapins au réflexe oculo-cardiaque nul au départ. Nous avons pu également proposer une définition plus précise de l'unité vagotonisante.

L'action caractéristique de l'extrait vagotonisant sur le réflexe oculo-cardiaque se retrouve avec la fraction globulinique γ - β_2 du sérum du chien. Comme à l'électrophorèse sur papier la fraction la plus importante de l'extrait pancréatique vagotonisant migre comme une globuline β_2 , on peut se demander si la substance vagotonisante ne serait pas transportée dans le sérum du chien avec les globulines β_2 .

Deux des actions attribuées au départ à l'hormone vagotonisante sont dues en fait à d'autres substances. Ainsi, l'action respiratoire est due à la contropnéine, dont l'étude fera l'objet de la deuxième partie de ce travail.

L'action de l'extrait sur la glycémie est due à des traces d'insuline.

Par contre, deux nouvelles actions de l'extrait vagotonisant ont été constatées pour la première fois : son action contractante lente des muscles lisses et l'augmen-

tation de la perméabilité capillaire sous l'influence de l'extrait.

En principe, ces deux nouvelles actions, jointes aux actions vagotonisante, hypotensive et vasodilatatrice, permettraient de rapprocher l'extrait vagotonisant du groupe des kinines. Mais nous n'oublions pas d'une part, que les préparations actuelles de l'extrait vagotonisant contiennent encore d'autres activités qui s'exercent sur la glycémie, la respiration, l'hématopoïèse, sur l'activité de la cholinestérase sérique et sur la stéatose hépatique. Nous n'oublions pas non plus d'autre part, que les préparations actuelles de l'extrait sont encore chimiquement complexes. En présence d'un extrait hétérogène exerçant de multiples actions biologiques on peut se demander si toutes ces actions peuvent être attribuées au même principe actif ? L'exemple de l'action respiratoire et de l'action hypoglycémiante montre que ce n'est pas toujours le cas. Il est donc indispensable de séparer les composants de l'extrait actuel et voir quelles sont les actions qui se retrouvent dans la fraction capable de renforcer l'excitabilité du système nerveux parasympathique.

DEUXIEME PARTIE

EXTRAIT PANCREATIQUE A ACTION RESPIRATOIRE

I. — ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT PANCREATIQUE A ACTION RESPIRATOIRE

Une technique pour l'extraction et la purification de l'extrait pancréatique à action respiratoire à partir du pancréas de bœuf a été élaborée et décrite en 1958 (26). Nous avons pu obtenir par extraction hydroalcoolique en milieu acide, suivie de la précipitation de l'insuline à son point isoélectrique (pH 5,2), de l'élimination de la vago-tonine par précipitation au Cl_2Zn , de l'élimination de faibles quantités résiduelles d'insuline par précipitation au ferrocyanure de potassium, et de l'élimination de la substance hyperglycémiant par précipitation fractionnée à l'alcool, un extrait physiologiquement actif sur la respiration qui ne modifie ni le taux de glycémie ni le réflexe oculo-cardiaque des animaux d'expérience.

Cet extrait se présente sous forme d'une poudre amorphe, très soluble dans l'eau à tout pH. L'extrait est précipité de ses solutions par les sels à partir et en dessous de pH 4,0, mais à ce pH ne précipite pas avec le ferrocyanure de potassium. Le SO_4Mg et le Cl Li ainsi que le

ClNa sont utilisés dans la préparation et dans l'étude de l'extrait respiratoire comme sels précipitants. L'alcool précipite la substance respiratoire à partir de 70°.

Dans le dialysat d'une solution d'extrait pancréatique respiratoire à 2,5 % dans un tampon acétate-acide acétique à pH 3,8 et de forme ionique 0,1 à travers une membrane de cellulose pendant 12 heures à 4° C on ne trouve ni d'azote avec la micro-méthode de KJELDAHL, ni de groupe-

TABLEAU X

Préparations	Analyse centésimale (1)						Cen- dres (2)	Humi- dité (3)
	C	H	N	S	O	Total		
Extrait res- piratoire	(4) 48,969	(4) 7,10	(5) 15,63	(7) 2,3	(8) 21,01	100	2,15	9,32
Lot 50	"	"	(6) 15,86	"	25,79	100	2,15	2,0
Extrait va- gotonisant N.F.	(9) 48,8	(9) 7,8	(9) 13,9	(9) 3,27	(8) 26,23	100	(9) 0,15	-
Lot 141								
Insuline	(9) 53,0	(9) 6,8	(9) 15,4	(9) 3,14	(8) 21,66	100	-	-

- (1) Par rapport à substance sèche, cendres déduites.
- (2) Résidu combustion selon Liebig par rapport à substance sèche.
- (3) Poids constant sur P_2O_5 .
- (4) Liebig.
- (5) Kjeldahl.
- (6) Dumas.
- (7) Gravimétrie.
- (8) Par différence sur 100.
- (9) D. Santenaise ; exposés annuels de Biochimie Médicale,
3ème série, 1942, p. 239.

ments $-NH_2$ libres avec la technique de MOORE et STEIN (52), ni de groupements réducteurs en provenance de sucres ou de polysaccharides. Ces résultats permettent d'attribuer à l'extrait pancréatique à action respiratoire un

caractère macromoléculaire (masses moléculaires supérieures à environ 10 000).

Le tableau X montre la composition centésimale de l'extrait respiratoire « Lot 50 » obtenu à l'Institut Battelle de Genève. Le rapport poids sec/azote = 6,3 fait penser à une protéine. Le caractère amphotère de l'extrait observé à l'électrophorèse à différents pH ainsi que sa composition centésimale, le rapport Poids subst. sèche/N = 6,3 et sa masse moléculaire importante permettent de classer l'extrait pancréatique à action respiratoire parmi les substances de nature protidique.

Nous avons voulu tester l'homogénéité de cet extrait protidique et pour ce faire nous avons eu recours aux méthodes de précipitation fractionnée, électrophorèse en milieu libre et sur papier, à l'ultracentrifugation analytique, à l'extracton et dosage gravimétrique des lipides et à l'étude chromatographique qualitative des acides aminés, comme nous l'avons fait pour l'extrait pancréatique à action vagotonisante.

Courbes de précipitation fractionnée

Ayant appliqué à l'extrait respiratoire la même technique que celle que nous avons utilisée pour l'extrait vagotonisant, nous avons réalisé un grand nombre d'expériences, dont nous donnons deux exemples dans les fig. 11 et 12. Le tracé de la fig. 11 montre le résultat d'une expérience faite sur un extrait respiratoire en solution dans de l'eau distillée à la conc. de 2 %, le pH étant ajusté à 2,8. Le sel précipitant était le SO_4Mg , on voit 3 segments de droites à pentes différentes sur ce tracé.

La fig. 12 montre un tracé sur lequel on distingue 4 segments de droites. Ce tracé a été obtenu avec comme sel précipitant du SO_4Mg sur une solution d'extrait respiratoire au pH 4,7 et à la conc. de 10 %.

Ces deux exemples, ainsi que plusieurs autres expériences, montrent que l'extrait respiratoire est susceptible d'être séparé en plusieurs constituants de solubilités différentes.

FIG. 11.

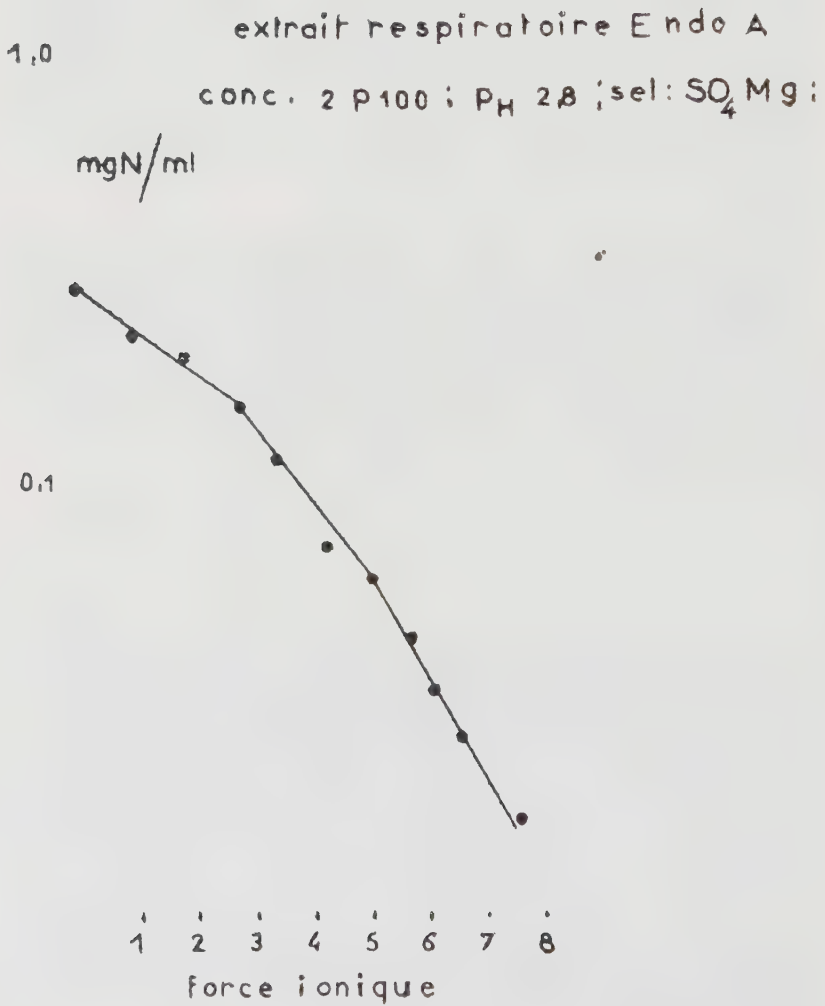
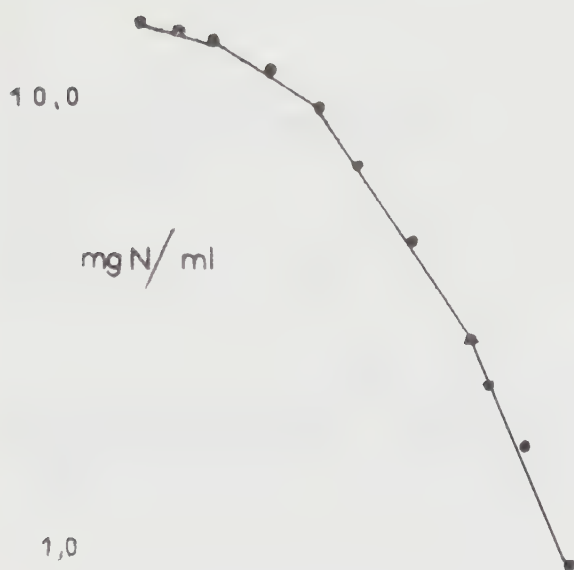


FIG. 11: Courbe de précipitation fractionnée d'un extrait respiratoire à 2 %.

FIG. 12.



extrait respiratoire Endo A

conc. 10 p 100 ; p_H 4,7 ; sel: 50 Mg;

FIG. 12: Courbe de précipitation fractionnée d'un extrait respiratoire à 10 %.

Analyse électrophorétique

Nous avons soumis un certain nombre de préparations d'extrait respiratoire à l'analyse électrophorétique. Nous avons utilisé la technique de Tiselius en milieu libre et également la technique d'électrophorèse sur papier. Une série d'électrophorèses réalisées en milieu libre aux pH de 3,90, 4,80 et 5,02 ont permis de situer la zone isoélectrique appa-

rente de l'extrait respiratoire aux environs de pH 4,9. Les meilleures séparations s'obtiennent à des pH nettement alcalins, vers pH 8,6-8,8. Des électrophorèses dans du glycolle à pH 8,8 ou dans le tampon véronal à pH 8,6 permettent de distinguer 8 à 9 fractions dans l'extrait brut (fig. 13). Au cours de la purification le nombre des frac-

Fig. 13

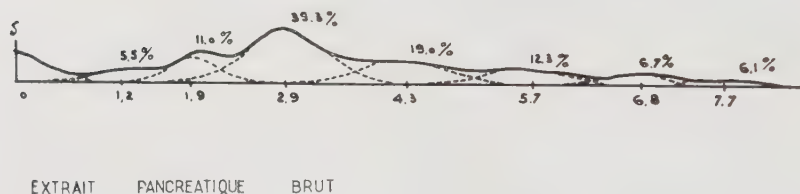


Fig. 14

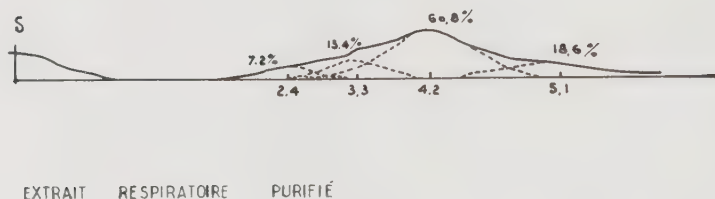


FIG. 13: Electrophorèse d'un extrait pancréatique brut.

FIG. 14: Electrophorèse d'un extrait respiratoire purifié.

tions diminue et dans les cas favorables on obtient un produit qui ne contient que 4 fractions séparables à l'électrophorèse. Une de ces 4 fractions représente à elle seule 50 à 60 % du total des extraits physiologiquement actifs. Par contre dans une préparation à faible activité respiratoire cette même fraction ne représente que 15 % des protéines présentes. Il semble donc que l'activité respiratoire est liée à la présence de cette fraction à la mobilité électrophorétique moyenne de 4,0 (entre 3,8 et 4,2 selon les préparations). Cette vitesse de migration correspond à celle d'une globuline α_2 des protéines sériques (3,6-4,5) (fig. 14).

A l'électrophorèse sur papier l'extrait respiratoire se sépare mal et des traînées importantes se forment entre les taches. On peut voir néanmoins, après coloration des bandes avec le bleu de bromophénol, et en faisant migrer

côte à côte sur le même papier du sérum sanguin et l'extrait respiratoire, qu'une tache importante de l'extrait se situe au niveau des globulines β_1 - α_2 du sérum. La coloration avec le noir Soudan ne permet pas de mettre en évidence des fractions lipoprotidiques dans l'extrait respiratoire.

Ultracentrifugation analytique

Un échantillon d'extrait respiratoire a été soumis à l'ultracentrifugation analytique à la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C. N. R. S. (*). Une série de trois ultracentrifugations avec 3 solutions d'extrait à concentrations différentes réalisées à la température moyenne de 20° C dans un tampon véronal de pH 8,6 dans une cellule de 12 mm d'épaisseur, à la vitesse de rotation de 59 780 t/mn a permis de calculer pour l'extrait respiratoire le coefficient de sédimentation $S_{20} = 1,8$ (fig. 15).

On ne voit pas apparaître un deuxième pic et il n'y a pas de séparation de composants lipoprotidiques. Mais le pic unique est un peu étiré et fait penser à la présence de plusieurs constituants de masses moléculaires rapprochées. D'autre part, le décalage entre les lignes de base avant et après le pic indique la présence de petites molécules.

Extraction et dosage gravimétrique des lipides

Au cours de la mise au point de la technique de préparation de l'extrait pancréatique à action respiratoire, nous avons essayé à plusieurs reprises de remplacer par la lyophilisation le séchage sous vide du précipité final. Comme chaque tentative de lyophilisation nous a donné un produit inactif, nous avons pensé à la présence dans notre extrait d'une lipoprotéine dont la dénaturation par la lyophilisation expliquerait la perte de l'activité biologique.

Nous avons cherché à extraire les substances lipidiques exactement comme nous avons procédé pour l'extrait vagotonisant : trois extractions successives de 8 heures avec de l'alcool absolu, de l'éther et du méthylal suivies de l'évaporation des solvants et séchage à poids constant ont donné 8,8 mg % de matières lipidiques. Cette teneur en lipides est considérable. Toutefois nous n'avons pas obtenu

(*) Nous remercions la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C. N. R. S. d'avoir bien voulu réaliser ces expériences.

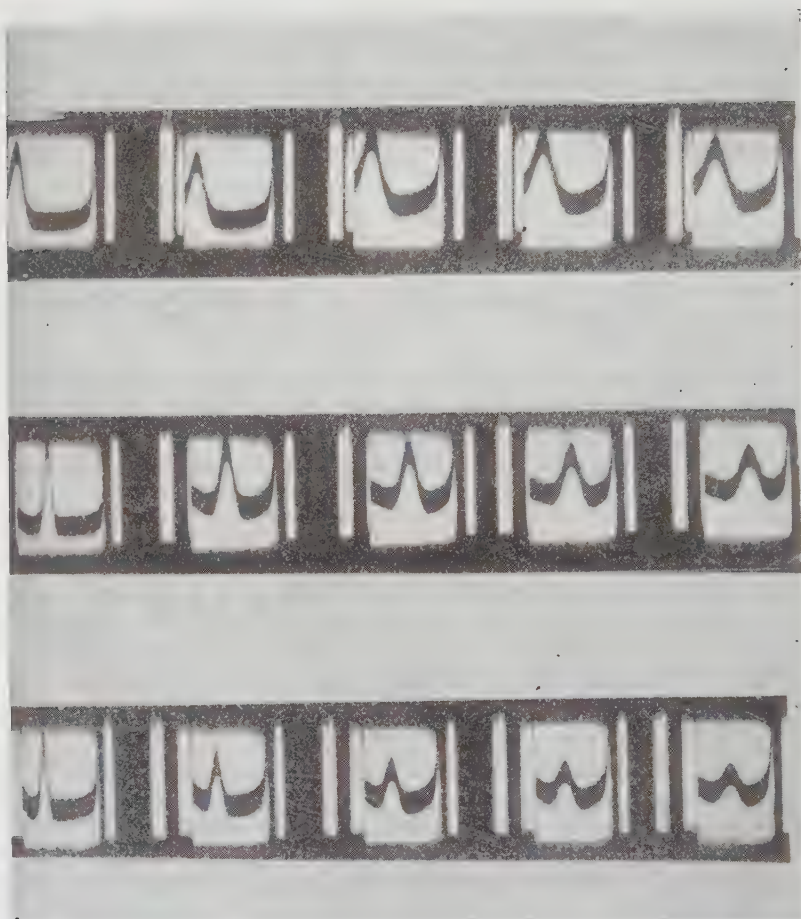


FIG. 15: Ultracentrifugation analytique de l'extrait pancréatique à action respiratoire.

la coloration avec le noir Soudan d'une fraction lipoprotidique à l'électrophorèse sur papier. Nous reprendrons l'étude de ce problème quand nous aurons isolé à l'état pur le principe actif respiratoire.

Chromatographie des acides aminés

Nous avons voulu connaître les acides aminés qui composent les préparations actuelles de l'extrait pancréa-

tique respiratoire. Nous avons utilisé pour cela la technique de chromatographie sur papier à deux dimensions. Un échantillon d'extrait respiratoire a été hydrolysé dans de l'acide chlorydrique 5 N pendant 24 heures. Après dessalage deux chromatographies ont été réalisées. Dans la première les solvants étaient dans une dimension un mélange d'une partie d'ac. acétique pour quatre parties de butanol et six parties d'eau, dans l'autre dimension du phénol saturé d'eau (fig. 16). Dans la deuxième chromatographie le mélange

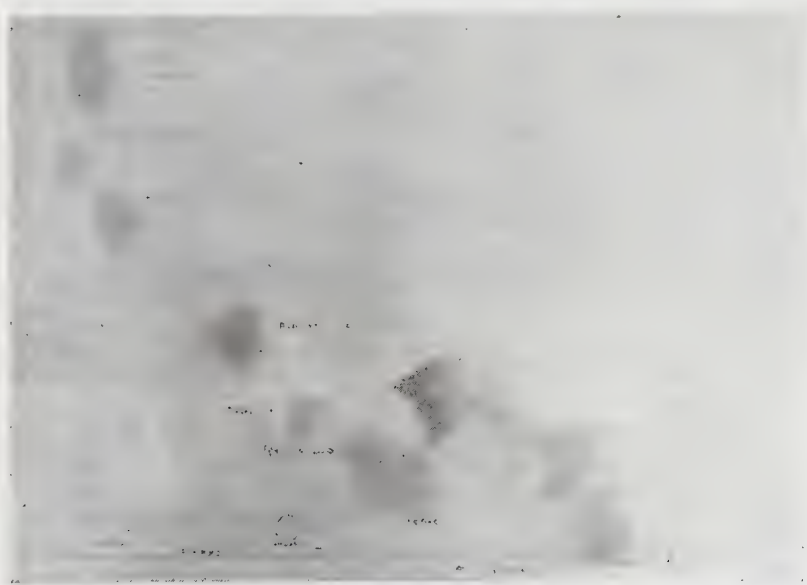


FIG. 16 : Chromatographie des acides aminés de l'extrait pancréatique à action respiratoire.

butanol — ac. acétique — eau a été utilisé dans les deux dimensions (fig. 17).

Après révélation avec la ninhydrine on a pu identifier les seize acides aminés suivants : ac. glutamique, ac. aspartique, alanine, arginine, cystéine, glycocole, histidine, isoleucine, leucine, lysine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine.

Donc, la plupart des acides aminés biologiques se retrouvent dans l'hydrolysat de l'extrait pancréatique à action respiratoire.

sérum du chien, nous avons tout naturellement pensé à rechercher également l'activité respiratoire dans ces mêmes fractions. Nous avons utilisé pour cela le « test au CO_2 » que nous avons soumis à une étude critique à l'aide des méthodes statistiques déjà appliquées au réflexe oculo-cardiaque. Comme les formules employées sont les mêmes, nous n'exposerons ici que le principe du test, les résultats de nos calculs, et finalement les résultats de l'application de ce test à l'étude des fractions sériques du chien.

Le test au CO_2 se pratique sur le cobaye mâle de 300 à 500 g. Le dispositif expérimental (fig. 18) comporte trois

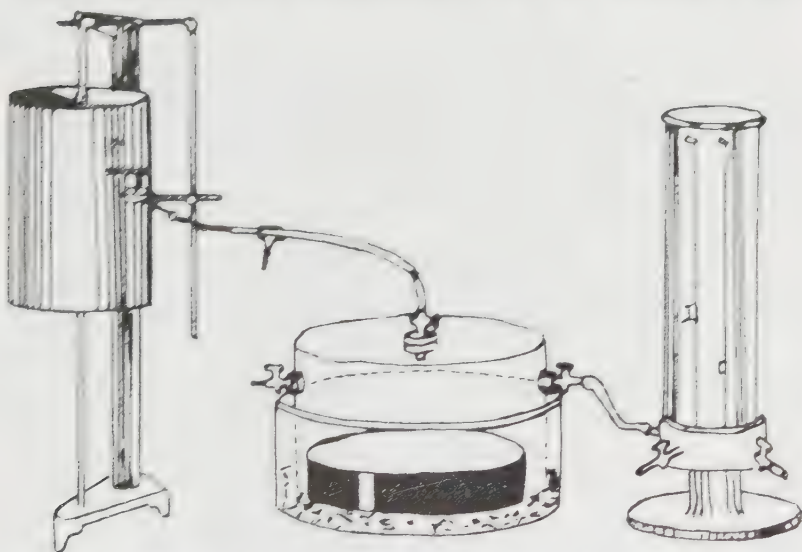


FIG. 18: Dispositif pour la pratique du « test au CO_2 » chez le cobaye.

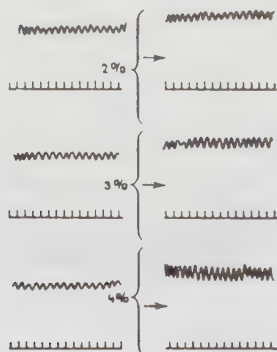
parties dont la première est la source de mélange air-gaz carbonique de titre connu.

La deuxième partie du montage est le dispositif destiné à recevoir le cobaye. Le fond d'un cristallisoir est tapissé de caoutchouc mousse sur lequel repose un socle en plâtre. Le cobaye placé sur ce socle est recouvert d'une cloche qui l'isole d'une façon étanche grâce à une couche d'eau de 2-3 cm au fond du cristallisoir. La cloche est munie de trois tubulures à robinet. Deux tubulures latérales assurent l'entrée et la sortie de l'air ou du mélange air-gaz carbonique, tandis que la tubulure supérieure relie

l'atmosphère de la cloche au dispositif inscripteur. Ce dispositif, qui représente la troisième partie du montage, comporte une capsule de Marey et un tambour enregistreur.

Le cobaye étant placé sous la cloche, on enregistre d'abord sa respiration dans l'air pur pendant vingt à trente secondes. Ensuite, on fait passer sous la cloche un mélange d'air contenant 2 % de gaz carbonique. Le cobaye respire ce mélange pendant une minute, ensuite on enregistre la respiration de l'animal dans le mélange gazeux. Après un repos de dix-quinze minutes environ, on recommence les mêmes manipulations, mais cette fois-ci avec un mélange contenant 3 % de gaz carbonique et ainsi de suite jusqu'à 6 % de gaz carbonique.

Pour un certain taux de gaz, on constate sur l'enregistrement une nette augmentation de l'amplitude respiratoire. C'est cette valeur seuil du taux de gaz carbonique dans l'air inspiré qui est alors retenue comme seuil et l'on dira que le test au CO_2 est positif pour le pourcentage de gaz carbonique dans le mélange correspondant (fig. 19).



Enregistrement de la respiration suivant les conditions expérimentales décrites dans le texte, au cours de l'inhalation de mélanges gazeux contenant de l'air et des pourcentages croissants de gaz carbonique.

A gauche, après inhalation d'air pur ;
à droite, après inhalation d'un mélange air + gaz carbonique.

FIG. 19

Une fois déterminée la sensibilité seuil du cobaye au gaz carbonique, on lui injecte le produit à étudier et on recommence la série d'enregistrements une deuxième fois exactement de la même façon. Si le produit injecté a augmenté la sensibilité du cobaye au gaz carbonique, dans la deu-

xième série d'enregistrements, l'augmentation seuil de l'amplitude respiratoire s'observera pour un taux de CO_2 inférieur à celui de la première série d'enregistrements.

Nous avons étudié la fréquence des variations spontanées du test sur deux lots de cobayes. Le premier lot de quarante cobayes a reçu une injection de 0,5 ml d'eau distillée, le deuxième lot a reçu le même volume de sérum physiologique. Le test de comparaison de deux moyennes montre, que l'écart entre les résultats des tests au CO_2 pratiqués avant et après injection d'eau distillée ou de sérum physiologique, n'est pas significatif. Pour ces deux séries d'expériences, nous avons calculé avec un degré de sécurité de 95 %.

Ayant ainsi démontré que les variations spontanées de la sensibilité des cobayes au CO_2 ainsi que l'influence des solvants sur la sensibilité sont négligeables, nous avons injecté à un troisième lot de quarante cobayes des extraits pancréatiques qui s'étaient montrés actifs sur l'excitabilité biochimique des centres respiratoires du chien.

Le test de comparaison de deux moyennes montre que dans ce cas la variation du test au CO_2 consécutive à l'injection d'extraits pancréatiques à action respiratoire est significative avec un degré de sécurité de 99 %.

L'étude statistique permet donc de conclure à la validité et à la sécurité de ce test.

Mais comme dans la pratique il est difficile, en raison de la durée de chacune des opérations techniques, d'opérer sur des lots de plus de quarante cobayes, nous avons cherché à déterminer les conditions dans lesquelles des résultats valables puissent être obtenus sur un lot aussi réduit. Nous comparons pour cela les variations spontanées du test observées sur les quatre-vingts cobayes témoins avec des cas théoriques suivants : la réponse respiratoire après injection de substance étudiée s'observe pour un mélange contenant 1 % de gaz carbonique en moins par rapport au test témoin chez deux, trois ou quatre cobayes. Le test de comparaison de deux moyennes montre que si quatre animaux voient leur sensibilité augmenter de 1 %, le résultat du test est significatif avec une sécurité supérieure à 99 %. Si trois cobayes sur quatre changent leur sensibilité de la même façon, le test est significatif avec un degré de sécurité de 99 %. Par contre, deux résultats positifs seulement sur quatre ne sont pas suffisants.

Sur la base de ces résultats, nous avons modifié la définition de l'unité de l'extrait respiratoire proposée en 1950 par D. SANTENOISE et ses collaborateurs (41) : c'est la quantité minima qu'il est nécessaire d'injecter par 100 g d'animal pour obtenir une réponse respiratoire avec une diminution de 1 % de gaz carbonique dans le mélange gazeux inhalé chez trois cobayes sur quatre.

Nous pouvions donc utiliser ce test pour la mise en évidence d'une éventuelle action respiratoire du sérum du chien. Nous avons de bonnes raisons de croire que cette activité existe dans le sérum, notamment D. SANTENOISE a démontré que l'excitabilité respiratoire d'un chien par inhalation d'air contenant du gaz carbonique diminue après pancréatectomie. Une excitabilité normale peut être rétablie par injection intraveineuse de sang prélevé dans la veine pancréatique d'un chien intact ou par croisement de la circulation sanguine du chien pancréatectomisé avec celle d'un chien intact (25). Ces expériences indiquent la présence dans le sang du chien d'une substance capable d'influencer l'excitabilité respiratoire de l'animal par le gaz carbonique. Cette action est comparable à celle de l'extrait pancréatique à action respiratoire. Nous avons cherché à localiser la substance active dans une fraction des protéines sériques dont nous avons décrit la préparation dans la première partie. Nous avons testé chacune des fractions sériques préparées sur au moins un lot de quatre cobayes. La dose utilisée était de 20 mg/kg pour chacune des fractions, injectée par voie sous-cutanée. Les résultats de ces tests sont réunis dans le tableau XI. Le signe + représente

TABLeAU XI

N° des sérums	Action sur le test au CO ₂		
	Fraction I	Fraction II	Fraction III
1	0	+	0
2	0	+	0
3	0	+	0
4	0	±	0
5	±	0	±
6	0	+	0

Résultats des "tests au CO₂" chez le cobaye des différentes fractions sériques du chien.

les tests comportant au moins trois réponses positives sur quatre, le signe $\pm$ figure pour deux résultats positifs, le 0 représente bien entendu un résultat nul.

On voit sur ce tableau que les premières et troisièmes fractions ne modifient pas l'excitabilité respiratoire du cobaye. Par contre les deuxième fractions contenant les globulines β_1 , α_2 et α_1 ont donné un test au CO_2 positif dans quatre cas sur six (fig. 20). Dans un cas le résultat était



FIG. 20 : Action sur le « test au CO_2 » du cobaye de la fraction II' du

sérum de chien à la dose de 20 mg/kg.

douteux, dans un autre cas le test répété deux fois s'est révélé négatif.

Ainsi l'action respiratoire, quand elle est présente dans le sérum du chien, peut être située dans une fraction à migration électrophorétique plus rapide que la fraction qui contient l'action sur le réflexe oculo-cardiaque. Le pic principal de l'extrait pancréatique à action respiratoire a également une vitesse de migration supérieure à celle du pic principal de l'extrait vagotonisant. Ces mobilités sont de l'ordre de 2,9 - 3,1 pour l'extrait vagotonisant, et de 3,9-4,2 pour l'extrait respiratoire.

Nous chercherons à mettre en évidence l'action respiratoire dans le sérum humain et en cas de résultats positifs,

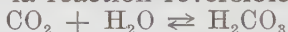
de déterminer de façon plus précise la fraction responsable de l'action respiratoire.

III. — INHIBITION DE L'ACTIVITE DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE PAR L'EXTRAIT RESPIRATOIRE

Comme nous l'avons brièvement exposé dans l'introduction, l'administration d'extrait pancréatique à action respiratoire à l'homme en état de veille, au chien anesthésié au chloralose, au cobaye ou au lapin (28, 30, 31), est régulièrement suivie d'une augmentation de la ventilation pulmonaire. Cette augmentation de la ventilation, mise en évidence par la mesure du débit respiratoire, aurait dû entraîner une baisse de la teneur du sang en gaz carbonique. Or au cours d'une série d'expériences encore inédites, où la concentration du CO_2 total du sang a été déterminée en même temps que le débit respiratoire, il est apparu que l'abaissement du CO_2 sanguin n'accompagne qu'environ une fois sur trois l'augmentation de la ventilation pulmonaire. Dans les autres cas la baisse du CO_2 total se produit seulement une ou deux heures après l'augmentation du débit respiratoire ou ne se produit pas du tout pendant toute la durée de l'expérience (trois à cinq heures).

Pour expliquer cette stabilité apparemment paradoxale du CO_2 total malgré l'hyperventilation, nous avons émis l'hypothèse d'une action de l'extrait pancréatique respiratoire sur l'activité de l'anhydrase carbonique.

Cet enzyme, dont la présence dans les globules rouges a été démontrée par MELDRUM et ROUGHTON (53), catalyse dans les deux sens la réaction réversible



et contribue par cela à l'élimination du sang du CO_2 produit par le catabolisme tissulaire.

a) Etude « *in vitro* ».

Dans un premier temps, nous avons étudié « *in vitro* » l'influence de l'extrait respiratoire sur l'action catalytique de l'anhydrase carbonique. Nous avons mesuré à l'aide d'une technique manométrique l'activité de l'enzyme dans les conditions déterminées, ensuite nous avons ajouté de l'extrait pancréatique ainsi que des préparations commerciales d'insuline, d'ovalbumine et de sérumbumine, et finalement de l'acétazolamide qui nous servait d'inhibiteur de

référence. Nous avons utilisé trois préparations d'anhydrase carbonique, dont une provenait du commerce. Nous avons préparé nous-mêmes les deux autres selon la technique de Scott et Mendive (54). Cette technique consiste à centrifuger les globules rouges du bœuf, les laver au sérum physiologique, les laquer et extraire l'enzyme à basse température avec de l'alcool éthylique et du chloroforme. Après centrifugation on précipite l'enzyme contenu dans le surnageant, d'abord avec une solution saturée d'acétate de plomb, puis après redissolution dans du phosphate bipotassique par saturation avec du sulfate d'ammonium. Le précipité recueilli par filtration, redissout dans l'eau et dialysé est agité avec un mélange d'alcool et de chloroforme. On élimine un précipité rougeâtre, on dialyse la solution alcoolique de l'enzyme et on reprécipite avec du sulfate d'ammonium. Après une nouvelle redissolution du précipité dans l'eau, on élimine une impureté par précipitation avec une faible concentration d'acétate de plomb, ensuite une autre avec un gel d'alumine. Finalement, la solution contenant l'enzyme est concentrée et séchée sous vide.

Les dosages de l'activité enzymatique sont effectués à la température de $0^{\circ} \text{C} \pm 0,05$ dans un appareil de Warburg. On introduit dans la partie principale d'une fiole de Warburg 0,5 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 0,1 M qui nous servait de substrat, et 1 ml d'un tampon obtenu par mélange de trois volumes d'une solution 0,1 M de phosphate disodique et de deux volumes de solution 0,1 M de phosphate monosodique. Le diverticule latéral contient en solution dans le tampon des quantités variables d'enzyme sous un volume final de 0,2 ml. Pour les expériences d'inhibition, l'inhibiteur étudié était en solution dans le tampon dans la fiole principale. Chaque série d'expériences comporte une fiole témoin sans enzyme.

On agite les manomètres pendant 10 mn pour atteindre l'équilibre thermique, ensuite on réalise le mélange enzyme-substrat et on suit le dégagement du gaz carbonique toutes les 15 mn pendant 90 secondes.

Nous avons étudié le dégagement du CO_2 en faisant varier la concentration de l'enzyme de 1 à 15 γ . Comme avec 5 γ par fiole nous avons toujours obtenu une droite en portant le temps en abscisses et le dégagement de gaz carbonique en ordonnées, nous avons retenu cette concentration enzymatique pour nos expériences d'inhibition.

En reprenant ce même protocole avec 5 γ d'enzyme, nous avons dissous dans le tampon des quantités variables

de deux préparations différentes d'extrait pancréatique à action respiratoire. Pour chaque substance employée, nous avons recherché la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition de 50 % à l'aide des calculs suivants :

Si l'on désigne par :

- A. le dégagement de CO₂ exprimé en mm³ sans enzyme dans un temps t ;
- B. le dégagement de CO₂ exprimé en mm³ en présence d'enzyme dans le même temps ;
- C. le dégagement de CO₂ exprimé en mm³ en présence d'enzyme et d'une substance inhibitrice dans le même temps,

L'activité de l'enzyme peut s'exprimer par :

$$100 \frac{B - A}{A} \quad (1)$$

L'activité en présence de l'inhibiteur :

$$100 \frac{C - A}{A} \quad (2)$$

La diminution de l'activité due à l'inhibiteur :

$$100 \frac{C - B}{B - A}$$

Plusieurs séries d'expériences avec deux préparations différentes d'extraits respiratoire nous ont permis de constater que ces extraits inhibent l'anhydrase carbonique.

Le tableau n° XII rassemble les résultats obtenus.

TABEAU XII

Substance employée	Dose γ	CO ₂ dégagé en 90 sec. (exprimé en mm ³)			Taux de l'inhibition 100 $\frac{C - B}{B - A}$
		sans enzyme	avec enzyme	avec enzyme + extraits respiratoires	
Extrait respiratoire Lot 56	100	21	102	78	- 30 %
	250	21	100	59	- 50 %
	300	15	93	16	- 98,7%
Extrait respiratoire Lot 57	50	20	97	81	- 20 %
	110	18	98	58	- 50 %
	200	17	101	17	-100 %

L'examen de ces chiffres montre que pour obtenir une inhibition de 50 %, il faut mettre en jeu 250 γ de substance

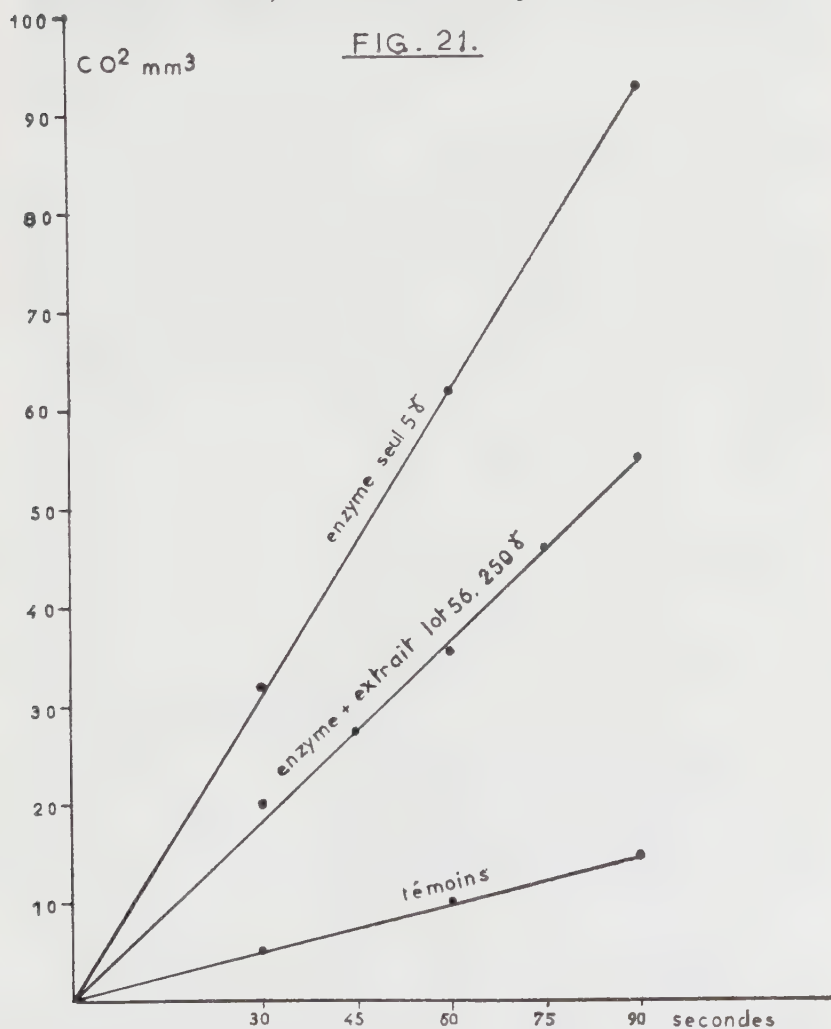


FIG. 21 : Inhibition à 50 % de l'activité de l'anhydrase carbonique par 250 γ d'extrait respiratoire lot 56.

pour la préparation n° 56 (fig. 21) et 110 γ pour la préparation n° 57 ; 300 γ de l'extrait n° 56 conduisent à une inhibition presque totale.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats des titrages physiologiques de ces deux préparations, titrages pratiqués à l'aide du test au CO_2 précédemment exposé. La préparation 56 est active sur l'excitabilité des centres respiratoires à la dose de 0,50 mg/kg et la préparation 57 à la dose de 0,25 mg/kg ; l'activité physiologique semble donc être nettement en rapport avec le pouvoir inhibiteur sur l'anhydrase carbonique.

Nous nous sommes alors demandé si cette action inhibitrice de l'extrait respiratoire était spécifique ou au contraire commune à beaucoup de protéines. Nous avons choisi alors l'extrait vagotonisant, l'ovalbumine, la sérumalbumine, et l'insuline. Pour les trois premiers cités, l'inhibition à 50 % n'a été obtenue que pour des quantités variant de 2 500 à 3 000 γ . A ces mêmes concentrations l'insuline n'exerçait aucune action inhibitrice sur l'anhydrase carbonique.

Enfin, comme dernier témoin, nous avons obtenu une inhibition à 50 % avec 0,05 γ d'acétazolamide par essai.

Le tableau XIII rassemble pour les diverses substances

TABEAU XIII

Substance utilisée	Dose de substance nécessaire pour obtenir une inhibition de 50 %.	
Acétazolamide	0,05	γ
Extrait respiratoire 56	250	γ
Extrait respiratoire 57	110	γ
Extrait vagotonisant 16	2.500	γ
Ovalbumine	3.000	γ
Sérumalbumine	3.000	γ
Insuline	> 3.000	γ

utilisées les doses nécessaires pour obtenir une inhibition de 50 %.

Ainsi donc l'extrait respiratoire présente des propriétés inhibitrices de l'activité de l'anhydrase carbonique, sans toutefois que cette propriété soit exactement comparable à celle de l'acétazolamide. Cependant, l'action inhibitrice de l'extrait respiratoire peut être considérée comme spécifique.

En effet, aucune des protéines utilisées et en particulier ni l'insuline, ni l'extrait vagotonisant, qui proviennent eux aussi du pancréas, n'inhibent l'anhydrase carbonique sinon à des concentrations très élevées, incompatibles avec une action physiologique.

Il ressort également de nos expériences que les doses d'extrait respiratoire permettant d'obtenir une inhibition à 50 %, sont de 2 000 à 5 000 fois plus fortes que les doses correspondantes de l'acétazolamide. Cette constatation appelle plusieurs remarques. Tout d'abord la masse moléculaire de l'acétazolamide n'est que de 222, tandis que la molécule protidique de la centropnéine doit être nettement plus importante. Il est établi également que l'inhibition due à l'acétazolamide diminue quand la température augmente, et les protéines sériques diminuent également l'efficacité de cette inhibition, tandis qu'il n'en est peut-être pas de même avec la centropnéine.

b) *Etude « in vivo ».*

Nous nous sommes rendu compte que malgré tout l'intérêt que présente la démonstration *in vitro* de l'inhibition de l'anhydrase carbonique par l'extrait respiratoire, nous devons rapprocher le plus possible nos conditions expérimentales des conditions physiologiques. Dans ce but, nous avons entrepris l'étude *in vivo* de l'influence de l'extrait pancréatique respiratoire sur l'activité anhydrique des globules rouges du rat à l'aide de la technique d'Altschule et Lewis (55) que nous avons légèrement modifiée. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les dosages se font à la température physiologique, et les conditions expérimentales et les calculs sont établis de façon à obtenir une relation linéaire entre la concentration de l'enzyme et l'activité mesurée.

Nous avons travaillé sur trois lots de rats blancs de souche K de 200 à 400 g. Les rats témoins ont reçu 2 ml de sérum physiologique par voie intrapéritonéale ; les autres rats, soit 30 mg pour 100 g de poids d'extrait respiratoire, soit la même dose d'acétazolamide en solution dans 2 ml de sérum physiologique. Une heure après l'injection les rats sont sacrifiés par décapitation et leur sang recueilli sur héparine. On procède sur ce sang hépariné à une numération des hématies et à la détermination de la valeur hématocrite par centrifugation à 5 000 t/mn pendant une demi-heure.

Les dosages de l'activité anhydrique se font sur du sang laqué et dilué avec de l'eau distillée de manière à obtenir des dilutions à 1/20, 1/50 et 1/200. On introduit dans la partie principale d'une fiole de Warburg 0,5 ml de sang dilué ou un volume égal d'eau distillée pour les expériences témoins. On ajoute deux perles de verre et 1 ml d'un tampon obtenu par mélange à parties égales d'une solution de phosphate monopotassique et d'une solution de phosphate disodique à 0,2 M chacune. Ce tampon

différences des paires
de lectures

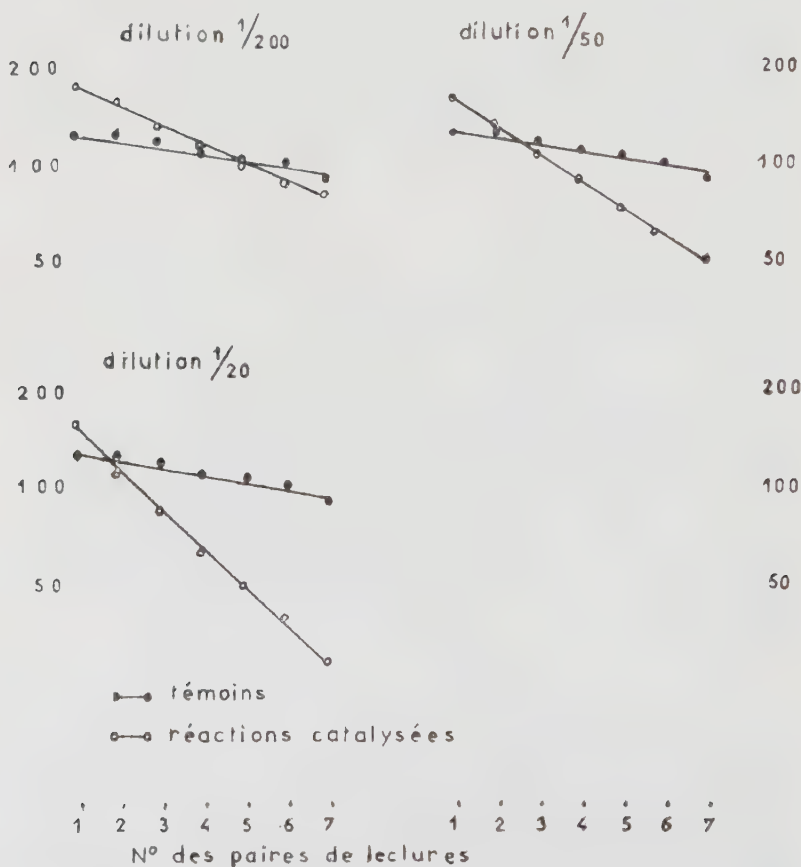


FIG. 22: Tracés des log. des paires de lectures du manomètre en fonction du temps. Les 7 paires de lectures montrent le déroulement de la réaction pendant 90".

FIG. 23.

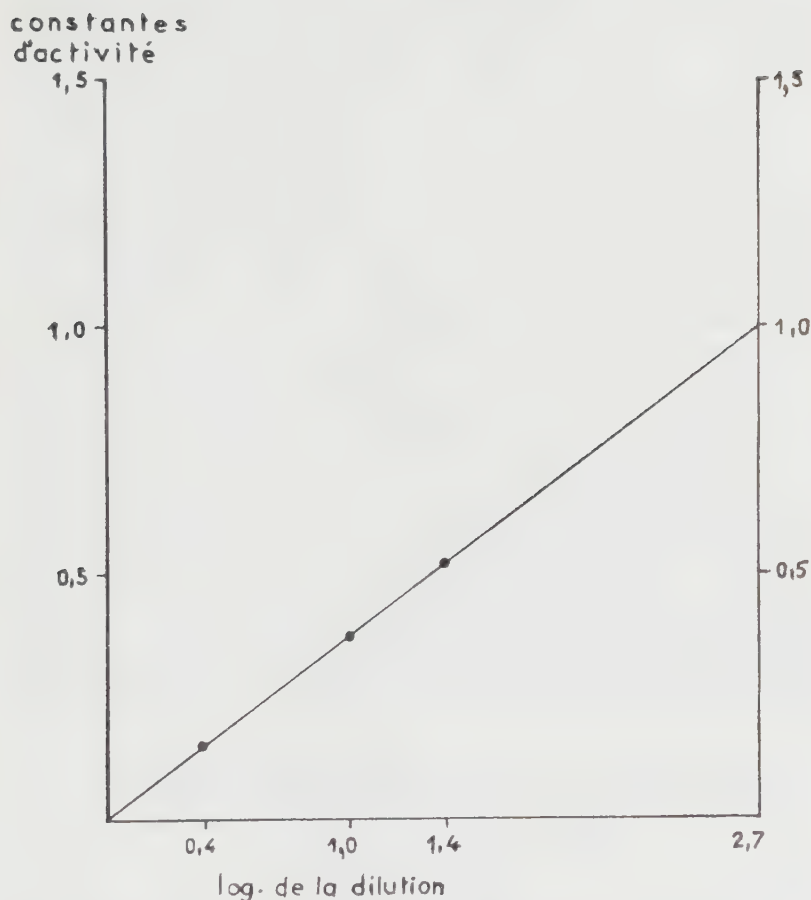


FIG. 23 : Tracé des constantes d'activité de l'enzyme pour chaque dilution du sang, en fonction du log. de la dilution. Extrapolation pour obtenir l'activité pour une dilution zéro.

assure un pH de 6,8 environ. La diverticule de la fiole contient 1 ml de substrat qui est une solution de bicarbonate de sodium 0,2 M dans de la soude 0,02 M, conservée en ampoules scellées et diluée au moment de l'emploi avec un volume égal d'eau distillée. On fixe la fiole remplie sur le manomètre, on place la fiole dans le bain-marie à 37° C et on agite pendant 10 mn pour atteindre l'équilibre thermique. Ensuite on mélange l'enzyme et le substrat et on agite avec le robinet ouvert pendant

90 secondes pour les expériences d'auto-hydrolyse, pendant 50 secondes pour la dilution à 1/200, pendant 40 secondes pour la dilution à 1/50 et pendant 30 secondes pour la dilution à 1/20. Ensuite on ferme le robinet et on suit le dégagement de gaz carbonique pendant 3 mn en faisant une lecture toutes les 15 mm. Ayant obtenu pour les trois dilutions et pour l'autohydrolyse du substrat deux parallèles qui s'accordent bien, on calcule les résultats selon la méthode de Mitchell, Pozzani et Fessenden (56). On groupe par paires les lectures obtenues à 90 secondes d'intervalle et on calcule les différences. Le tracé des logarithmes de ces différences en fonction du temps donne une ligne droite (fig. 22), dont la pente multipliée par 2,303 donne K, la constante de vitesse de premier ordre, caractéristique de l'activité anhydrasique de l'échantillon considéré. Les chiffres obtenus pour les trois dilutions de sang, après déduction de la valeur Kt du témoin à l'eau distillée sont portés en ordonnées, les abscisses étant logarithmes de la dilution. Une ligne droite partant de l'origine et passant par les trois points expérimentaux permet d'obtenir par extrapolation la valeur qui correspond à une dilution zéro, c'est-à-dire à l'activité de 0,5 ml de sang non dilué (fig. 23). Ayant au préalable déterminé la valeur hématocrite et effectué une numération des hématies, on peut calculer l'activité anhydrasique soit pour 1 ml de sang non dilué, soit pour 1 ml d'hématies, soit enfin pour 1 billion d'hématies.

Le tableau XIV contient les résultats obtenus avec les hématies de six rats normaux pris comme témoins.

TABLEAU XIV

Activité de l'anhydrase carbonique des hématies de
rats témoins.

N° des animaux	Poids en g.	Numération des hématies	Valeur hématocrite	Unité d'anhydrase carbonique pour		
				1 ml de sang	1 ml d'hématies	1 billion d'hématies
1	320	6.030.000	39	2,63	6,53	0,436
2	320	7.260.000	40	3,42	8,55	0,471
3	300	5.980.000	38	2,60	6,83	0,434
4	320	7.200.000	41	2,70	6,58	0,333
5	220	6.760.000	41	3,17	7,70	0,468
6	200	6.160.000	40	3,00	7,50	0,487
Moyenne	280	6.565.000	39,8	2,92	7,28	0,438

Le tableau XV rapporte les chiffres d'activité de l'anhydrase carbonique des hématies de six rats ayant reçu 30 mg pour 100 g d'extrait pancréatique à action respiratoire en solution dans 2 ml de sérum physiologique.

TABEAU XV

Activité de l'anhydrase carbonique des hématies de rats ayant
reçu l'extrait pancréatique respiratoire.

N° des ani- maux.	Poids en g.	Numération des hématies	Valeur hémato- crite	Unités d'anhydrase carbonique pour		
				1 ml de sang	1 ml d'hé- maties	1 billion d'hématies
1	335	4.590.000	35	1,92	5,47	0,418
2	400	8.460.000	50	2,42	4,84	0,286
3	260	6.740.000	43	2,45	5,70	0,364
4	380	8.100.000	38	3,40	8,84	0,419
5	320	8.060.000	49	2,40	4,89	0,297
6	380	8.780.000	51	3,00	5,88	0,341
Moyenne	345	7.455.000	44	2,59	5,93	0,354

Afin de pouvoir comparer ces résultats avec ceux fournis par notre inhibiteur de référence, nous avons administré à trois rats 30 mg d'acétazolamide pour 100 g de poids.

Le tableau XVI consigne les résultats obtenus.

TABEAU XVI

Activité de l'anhydrase carbonique des hématies de
Rats ayant reçu de l'Acétazolamide.

N° des animaux	Poids en g.	Numération des héma- ties en million/mm ³	Valeur hémato- crite %	Unité d'anhydrase carbonique pur		
				1 ml de sang	1 ml d'hé- maties	1 billion d'hématies
1	295	7.320.000	43	1,66	3,85	0,218
2	225	7.120.000	40	1,74	4,35	0,244
3	215	8.780.000	42	1,46	3,47	0,166
Moyenne	245	7.740.000	41,6	1,62	3,89	0,209

D'autre part, ainsi qu'il est facile de le constater sur les trois premiers tableaux, le nombre d'hématies par mm³

de sang étant variable chez les jeunes rats (de 4 à 8 millions), nous n'avons comparé entre eux que les résultats corrigés en fonction de la valeur hématocrite et en fonction de la numération des hématies.

Dans le tableau XVII, nous avons réuni les valeurs moyennes ainsi corrigées des témoins et des animaux injectés et les pourcentages d'inhibition.

TABLEAU XVII

	Activité anhydrique moyenne pour			
	1 ml. d'hématies		1 billion d'hématies	
	Moyenne	Inhibition %	Moyenne	Inhibition %
Animaux témoins	7,28	—	0,438	—
Animaux avec Centropnéine	5,93	18,5	0,354	19,1
Animaux avec Acé-tasolamide	3,89	46,5	0,209	52,2
Rapport $\frac{\text{Inhibition Acétasol.}}{\text{Inh. Centropnéine}}$		2,51	2,73	

L'examen des résultats obtenus montre une nette action inhibitrice de l'extrait pancréatique à action respiratoire, cependant 2,5 à 2,7 fois moins intense que celle observée après administration d'acétazolamide.

En effet les pourcentages d'inhibition sont respectivement de 18,5 et 19,1 pour la Centropnéine et 46,5 et 52,2 pour l'acétazolamide.

L'application à nos résultats des méthodes statistiques fait apparaître que, dans le cas de l'extrait respiratoire, la moyenne obtenue diffère de la moyenne des témoins d'une manière significative avec un degré de sécurité de 95 %. Dans le cas de l'acétazolamide, le degré de sécurité atteint évidemment 99 %.

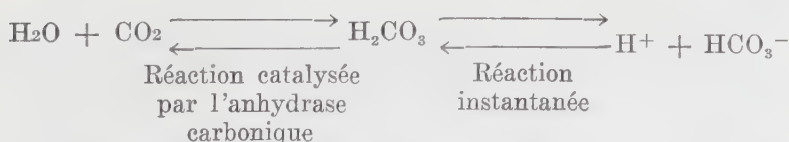
Du fait que nous travaillons sur des hématies laquées et en milieu tamponné, nous nous éloignons des conditions

physiologiques normales. Les activités anhydrasiques déterminées à l'aide de la méthode décrite ne peuvent donc être directement superposées à l'activité anhydrasique des hématies à l'intérieur de l'organisme vivant. Néanmoins les dosages effectués à l'aide de la technique d'Altschule et Lewis ont permis de déterminer les limites des variations de l'activité de l'anhydrase carbonique chez l'Homme normal (55) ainsi que des variations de cette même activité dans diverses conditions pathologiques (57, 58).

Nos expériences confirment donc seulement la diminution de l'activité anhydrasique du sang à température physiologique et dans des conditions expérimentales déterminées après administration à des animaux de l'extrait pancréatique à action respiratoire ; elles sont donc en parfait accord avec les expériences préalablement effectuées *in vitro* et les recourent.

IV. — ACTION DIURETIQUE DES EXTRAITS PANCREATIQUES A ACTION RESPIRATOIRE

Après avoir constaté l'inhibition *in vitro* et *in vivo* de l'anhydrase carbonique par l'extrait respiratoire, nous nous sommes demandés si l'action de l'extrait se limite à l'enzyme des globules rouges (21). On sait notamment, que l'anhydrase carbonique se trouve dans l'organisme également dans le pancréas, dans la muqueuse de l'estomac, etc... et surtout dans le rein, où elle participe également au maintien de l'équilibre acido-basique. En inhibant l'enzyme au niveau du tubule distal du rein, on empêche la formation de molécules d'acide carbonique, dont la dissociation fournit des ions H^+ et HCO_3^- selon le processus suivant (59) :



Normalement, les ions H^+ ainsi formés sont échangés contre les ions Na^+ et K^+ du filtrat glomérulaire et le bicarbonate reconstitué de la sorte passe dans le sang. L'inhibition de l'enzyme au niveau du rein revient donc à empêcher la réabsorption du Na^+ , du K^+ et des bicarbonates, qui sont éliminés en quantités accrues dans les urines

entraînant l'eau par un mécanisme osmotique. L'action diurétique de l'acétazolamide s'explique précisément par ce mécanisme (60).

Dans le but de savoir si l'action inhibitrice de l'anhydrase carbonique de l'extrait respiratoire se produit également au niveau du rein, nous avons entrepris une série d'expériences basées sur l'observation du débit urinaire facilement mesurable.

Nos premières observations ont porté sur des animaux anesthésiés chez lesquels nous avons examiné l'action respiratoire en même temps que l'action diurétique. Chez un lapin anesthésié à l'uréthane, chez trois chiens en anesthésie limite continue au chloralose, nous avons mesuré le débit urinaire à l'aide d'une sonde introduite dans la vessie pendant 2 à 4 heures avant et 3 à 6 heures après injection intraveineuse d'extraits pancréatiques respiratoires. Le tableau XVIII donne les moyennes horaires de débit urinaire avant

TABEAU XVIII

Indication des animaux	Débit moyen avant inject. exprimé en ml/h	Débit moyen après inject. exprimé en ml/h	Augmentation de la diurèse %
Lapin LXV	2	2,85	+ 42,5
Chien AL 521	47,2	62,7	+ 32,8
Chien AL 522	11,95	15,75	+ 31,8
Chien AL 524	9,5	12,66	+ 33,2

et après injection de 5 mg/kg d'extrait respiratoire ainsi que l'augmentation de la diurèse en % par rapport aux chiffres témoins.

On voit ainsi que, dans tous les cas, la diurèse augmente considérablement après administration d'extrait pancréatique à action respiratoire.

L'action diurétique étant qualitativement établie, nous avons cherché à l'étudier quantitativement et nous avons pratiqué un test de diurèse (61) sur le rat blanc de 200 g à jeûn depuis 18 heures. Les animaux, disposés par groupe de quatre dans des cages métaboliques reçoivent tous 5 ml de sérum physiologique par voie buccale et 1 ml en injection par voie intrapéritonéale. Huit de

ces animaux servent de témoins, 8 autres reçoivent la substance à étudier, soit par voie buccale en solution dans le 5 ml de sérum physiologique pour un premier groupe d'essais, soit par voie intrapéritonéale en solution dans un 1 ml de sérum physiologique, pour un deuxième groupe d'expériences.

Nous avons recueilli l'urine émise par les animaux dans une éprouvette graduée et nous avons noté heure par heure le volume d'urine des témoins ainsi que celui des animaux injectés. A la fin de la cinquième heure et de la vingt-quatrième, nous avons établi le rapport des volumes d'urines excrétées par les animaux préparés à ceux des animaux témoins. Le chiffre ainsi obtenu caractérise l'action diurétique du produit essayé.

Pour avoir une base de comparaison, nous avons réalisé nos expériences soit avec l'extrait pancréatique à action respiratoire, soit avec l'acétazolamide, qui avait déjà servi de référence pour nos expériences d'inhibition *in vitro* et *in vivo* de l'anhydrase carbonique. Nous avons administré l'acétazolamide ou l'extrait pancréatique à action respiratoire à la dose de 5 mg/kg et de 100 mg/kg. Les résultats de ces expériences se trouvent résumés dans le tableau XIX.

Il résulte des chiffres de ce tableau que l'acétazolamide est plus actif par voie buccale que par voie intrapéritonéale (fait déjà connu), tandis que, pour l'extrait respiratoire, l'activité est beaucoup plus importante par voie intrapéritonéale, surtout si on considère le résultat à la cinquième heure. Les résultats à la vingt-quatrième heure sont plus voisins quel que soit le mode d'administration.

Dans nos expériences *in vitro*, l'inhibition à 50 % de l'activité de l'anhydrase carbonique nécessitait des concentrations d'extrait respiratoire de 2 000 à 5 000 fois supérieures à celles de l'acétazolamide. Par contre, dans les expériences de diurèse, à doses égales, l'acétazolamide est seulement de trois à sept fois plus efficace que l'extrait pancréatique. Nous pouvons également remarquer qu'avec l'acétazolamide, l'action diurétique se manifeste très vite, dès la première heure, et l'effet atteint son maximum en cinq heures. Avec l'extrait respiratoire, l'action débute plus tardivement (vers la troisième heure, avec 5 mg/kg intrapéritonéale) et n'atteint son maximum que la vers la sixième-septième heure. L'action de l'acé-

TABLEAU XIX

Heures	Témoins 8 lots de 8 rats	Acétazo- lamide Voie buccale 5 mg/kg (2 lots de 8 rats)	Extrait respira- toire Voie buccale 5 mg/kg (2 lots de 8 rats)	Acétazo- lamide Voie in- trapéri- tonéale 5 mg/kg (2 lots de 8 rats)	Extrait respira- toire Voie in- trapéri- tonéale 5 mg/kg (2 lots de 8 rats)	Acétazo- lamide Voie buccale 100mg/kg (2 lots de 8 rats)	Extrait respira- toire Voie buccale 100mg/kg (2 lots de 8 rats)	Acétazo- lamide Voie in- trapéri- tonéale 100mg/kg (2 lots de 8 rats)	Extrait respira- toire Voie in- trapéri- tonéale 100 mg/kg (2 lots de 8 rats)
1	0	6,8	0	4,17	0	8,5	0	14,1	0,35
2	0,28	16,1	0	10,15	0,16	15,3	0	21,6	2,35
3	0,60	21,7	0	13,65	2,08	25,6	0	26,3	4,45
4	1,20	26,5	0,3	15,35	4,16	35,8	2,65	31,8	4,45
5	1,78	27,6	1,1	16,35	5,52	42,0	3,50	35,0	5,20
24	15,48	43,1	21,35	36,60	26,24	70,6	22,4	52,9	25,1
RAPPORT vol, urines rats inje- ctés vol, urines rats témoins à la fin 5ème heure		15,6	0,62	9,29	3,1	23,8	1,98	19,8	2,95
Même rapport à la fin des 24 Heures		2,7	1,3	2,3	1,6	4,5	1,4	3,4	1,6

Les chiffres de ce tableau représentent les ml d'urines émises jusqu'à la fin de l'heure indiquée.

tazolamide augmente nettement avec la dose, tandis qu'avec l'extrait pancréatique, l'administration de 100 mg/kg par voie intrapéritonéale donne à peu près la même action que 5 mg/kg.

Ainsi il se trouve démontré que les extraits pancréatiques à action respiratoire provoquent une augmentation progressive et durable de la diurèse chez l'animal normal. Cette action est différente qualitativement et quantitativement de celle de l'acétazolamide.

V. — DISCUSSION DES RESULTATS CONCERNANT L'EXTRAIT PANCREATIQUE A ACTION RESPIRATOIRE

Nos préparations actuelles d'extrait pancréatique à action respiratoire se présentent sous forme d'une poudre blanche, amorphe, contenant des substances de nature protidique. Les solutions de ces protides examinées à l'aide de tests de solubilité et d'électrophorèse se comportent comme un système polydisperse dans lequel au moins quatre fractions différentes peuvent être distinguées. L'extrait contient des lipides extractibles en quantité non négligeable, mais nous n'avons obtenu ni la coloration au noir Soudan à l'électrophorèse sur papier, ni la dissociation d'une fraction lipoprotidique à l'ultra-centrifugation analytique où nous n'avons obtenu qu'un seul pic. L'analyse chromatographique qualitative des acides aminés a permis d'identifier dans un hydrolysât de l'extrait la plupart des acides aminés qui sont présents dans l'organisme animal.

Bien que l'extrait soit encore chimiquement complexe, il ne renferme plus qu'une seule activité biologique connue : l'action respiratoire. Cette action, qui peut être titrée à l'aide du « test au CO_2 » d'une façon reproductible et avec une sécurité satisfaisante, se retrouve également dans la fraction $\beta_1 - \alpha_2 - \alpha_1$ du sérum du chien. En tenant compte de la mobilité électrophorétique du pic principal des extraits pancréatiques respiratoires, on peut supposer que l'activité respiratoire se trouve dans la fraction β_1 ou α_2 du sérum du chien.

Divers résultats expérimentaux nous ont amené à étudier l'action de l'extrait respiratoire sur l'anhydrase carbonique. Nous avons pu montrer *in vitro* et à 0°C une action inhibitrice faible, mais nette et reproductible et en rapport avec l'activité respiratoire. Grâce à une technique praticable sur le sang à 37°C , nous avons pu retrouver, après injection d'extrait respiratoire, la diminution de l'activité de l'anhydrase carbonique dans le sang du rat.

L'existence d'une action sur l'anhydrase carbonique nous a amené à rechercher une action diurétique de l'extrait respiratoire. Cette action existe, elle est relativement faible et n'augmente pas en fonction de la dose.

Dans toutes nos expériences sur l'anhydrase carbonique, nous avons utilisé comme base de comparaison l'action de l'acétazolamide, inhibiteur puissant de cet enzyme. Dans nos expériences *in vitro* et à 0° C l'acétazolamide s'est révélé 2 000 fois plus actif que l'extrait pancréatique. Mais dans les expériences de diurèse son activité n'était que de trois à sept fois supérieure à celle de l'extrait pancréatique, tandis qu'à doses égales, l'inhibition de l'anhydrase des globules rouges par l'acétazolamide n'était que de 2,5 à 2,7 fois plus intense que l'inhibition due à l'extrait pancréatique respiratoire. Il est intéressant de constater que l'écart dans les activités pondérales est beaucoup plus faible dans les expériences *in vivo*. Ce n'est probablement pas par hasard que l'activité relative de l'extrait pancréatique devient de plus en plus forte au fur et à mesure que nous nous rapprochons du domaine et des conditions de son action physiologique. En plus, il sera très probablement possible de tenir compte d'un écart dans les masses moléculaires des deux substances comparées, quand nous aurons obtenu à l'état pur le principe actif de l'extrait pancréatique à action respiratoire. Nous nous efforcerons donc de réaliser cette purification et de déterminer avec précision la composition et la structure de la substance respiratoire pancréatique.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR

La découverte de l'insuline et son étude par un grand nombre de chercheurs a amené la découverte de plusieurs substances pancréatiques biologiquement actives, dont certaines sont de nature hormonale. Th. BERSIN, dans son livre sur la biochimie des hormones (62) mentionne comme hormones pancréatiques l'insuline, le glucagon, la centropnéine, la vagotonine et la lipocaïc, toutes de nature protidique.

La vagotonine est parmi les premières substances pancréatiques décrites après l'insuline. Sa principale action s'exerce sur le système nerveux parasympathique dont elle augmente l'excitabilité. Cette action est mesurable à l'aide du réflexe oculo-cardiaque et se traduit également par un certain nombre de phénomènes comme le ralentissement du rythme cardiaque ou la baisse de la tension artérielle, etc... Plusieurs actions secondaires de la vagotonine ont été signalées dont certaines mériteraient une étude plus approfondie, comme par exemple l'action hématopoïétique. Il

serait également très important de reprendre l'étude de l'inhibition de la cholinestérase par l'extrait vagotonisant, qui est peut-être en rapport avec l'activité physiologique de la vagotonine. Il est apparu ces derniers temps que toutes les hormones exercent leur action en influençant un système enzymatique. BERSIN a proposé comme synonyme d'hormone le nom collectif d'effecteur d'enzyme. Dans l'introduction nous avons mentionné brièvement les quelques travaux parus sur l'inhibition de « la cholinestérase » par les extraits vagotonisants. Mais nous savons aujourd'hui qu'il existe au moins trois cholinestérases douées de propriétés physicochimiques différentes. Comme chacun de ces enzymes a ses substrats et ses inhibiteurs particuliers, il serait intéressant de voir si tous sont inhibés au même degré par l'extrait vagotonisant ou si ce dernier aurait une action plus nette sur un de ces enzymes.

Mais il est encore plus important et plus urgent de réaliser la séparation des composants de l'actuel extrait pancréatique vagotonisant, afin de pouvoir déterminer avec précision ses propriétés physicochimiques et les actions physiologiques qui se rattachent à la vagotonine proprement dite. Il est apparu que deux actions attribuées à l'origine à la vagotonine sont dues à d'autres substances.

La baisse de la glycémie et l'augmentation de l'excitabilité respiratoire consécutives à l'injection de l'extrait pancréatique vagotonisant montrent la présence de traces d'insuline et de centropnéine dans cet extrait.

Enfin il est important de remarquer que l'action caractéristique de la vagotonine sur le réflexe oculo-cardiaque se retrouve dans une fraction globulinique du sérum du chien.

Une autre fraction du sérum du chien augmente l'excitabilité des centres respiratoires du cobaye par le gaz carbonique, tout comme le fait l'extrait pancréatique à action respiratoire. Ce dernier a pu être préparé sous forme chimiquement encore complexe, mais ne contenant plus qu'une seule action physiologique, mesurable avec précision à l'aide de la technique dite « test au CO_2 ». L'action de l'extrait pancréatique respiratoire se manifeste également par une augmentation du débit respiratoire des animaux et de la capacité oxyphorique du sang. Nous avons pu montrer que l'extrait pancréatique respiratoire inhibe l'action de l'anhydrase carbonique *in vitro* et *in vivo* et exerce en plus de son action respiratoire une action diurétique. Cette action inhibitrice de l'anhydrase carbonique nous semble être en

rapport étroit avec le mécanisme d'action de la centropnéine. Il serait tentant et tout à fait possible d'élaborer des hypothèses pour expliquer l'action de l'extrait respiratoire sur l'excitabilité des centres respiratoires des animaux par le gaz carbonique ou sur l'augmentation du débit respiratoire. D'autant plus que la présence d'un inhibiteur sérique de l'anhydrase carbonique dans le sérum de certaines espèces d'animaux a été signalée par plusieurs auteurs (63, 64). On pourrait invoquer une accumulation du gaz carbonique dans le sang par suite de l'inhibition de l'anhydrase carbonique des globules rouges. L'augmentation de concentration sanguine du stimulant physiologique des centres respiratoires explique l'hyperventilation et la sensibilité accrue des cobayes au gaz carbonique dans le « test au CO_2 ». La compensation de modifications de cet ordre serait normalement le rôle du rein par augmentation de la réserve alcaline. L'inhibition de l'enzyme à ce niveau empêche de jouer ce mécanisme de compensation et explique l'action durable de l'extrait. Mais comme trop de points restent encore à préciser, nous préférons pour le moment ne pas aller au-delà des conclusions immédiatement déductibles de nos résultats expérimentaux. Par contre, nous nous attacherons à l'étude détaillée de l'inhibition de l'anhydrase carbonique par l'extrait respiratoire tant *in vitro* qu'*in vivo*. Mais pour pouvoir effectuer ces travaux dans des conditions de précision satisfaisantes, il nous semble indispensable auparavant d'obtenir à l'état chimiquement pur le principe actif respiratoire.

En conclusion, nous pouvons dire qu'un progrès considérable a été réalisé dans les recherches sur ces deux hormones pancréatiques depuis leur découverte par le Professeur SANTENOISE. L'activité des deux substances peut être dosée avec précision et pour l'activité respiratoire nous suivons une piste intéressante dont nous croyons qu'elle nous mènera à l'explication du mécanisme d'action de cette substance. En dépit des progrès, beaucoup reste encore à faire. Premièrement la purification et l'étude de la structure chimique des deux corps purs, ensuite l'étude physiologique et biochimique de l'action des substances pures, et finalement nous tenterons l'identification de ces deux hormones dans les protéines du sang humain.

BIBLIOGRAPHIE

1. SANTENOISE D., TINEL J. — C.R. Soc. Biol., 1923, **89**, 148.
2. GARRELON L., SANTENOISE D. — C.R. Soc. Biol., 1924, **90**, 470.
3. POPPER M. — C.R. Soc. Biol., 1924, **91**, 510.

4. VERDIER H. — Thèse, Nancy, 1930.
5. SANTENOISE D., PORCHER Y., VIDAKOVITCH M. — *C.R. Soc. Biol.*, 1932, **113**, 67.
6. SANTENOISE D. — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, Masson, 1942, p. 227.
7. FRANCK C. — Thèse, Nancy, 1935.
8. SANTENOISE D., FRANCK C., GRANDPIERRE R., VIDAKOVITCH M., COTLENKO V., COURNOT L. — *Rev. Path. Gén. Comp.*, 1954, n° 654, 3.
9. SANTENOISE D., GRANDPIERRE R., BIGET P.-L., RAMANAMANJARY W., ROBERT M. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1959, **17**, 136.
10. BOVET D., SANTENOISE D. — *C.R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 844.
11. SANTENOISE D., BOVET D. — *C.R. Acad. Sci.*, 1941, **212**, 936.
12. POLONOVSKI M., SANTENOISE D., PELOU A. — *C.R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 115.
13. SANTENOISE D., DROUET P.-L., GRANDPIERRE R. — *Bull. Acad. Méd.*, 1935, **113**, 801.
14. GRANDPIERRE R., GROGNOT P. — *C.R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 398.
15. GRANDPIERRE R., GROGNOT P. — *C.R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1262.
16. GRANDPIERRE R., GROGNOT P. — *C.R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 122.
17. GRANDPIERRE R., GROGNOT P. — *C.R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 350.
18. SANTENOISE D., FRANCK C., GRANDPIERRE R., VIDAKOVITCH M. — *C.R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 354.
19. SANTENOISE D., ALBOT G., CORTEVILLE M., THEVENOT R. — *Presse Médicale*, 1933, **61**, 982.
20. SANTENOISE D., ALBOT G., GROGNOT P., VIDAKOVITCH M., THEVENOT R., CORTEVILLE M. — *Rev. Path. Gén. Comp.*, 1954, n° 660, 921.
21. SANTENOISE D., ALBOT G., BAMBERGER J., COTLENKO V., THEVENOT R., COTLENKO P. — *Rev. Int. Hépat.*, 1955, **5**, 223.
22. CORTEVILLE M., RAMANAMANJARY W., THEVENOT R. — *Arch. Int. Pharm. Ther.*, 1952, **92**, 213.
23. POLONOVSKI M., SANTENOISE D. — *Presse Médicale*, 1952, **60**, 369.
24. SANTENOISE D., SANTENOISE Th., POLONOVSKI M., MICHEL G. — *C.R. Ac. Sci.*, 1951, **232**, 447.
25. ROBELET A. — Thèse, Lille, 1952.
26. SANTENOISE D., BIGET P.-L., ROBERT M., SANTENOISE Th., von HOLTEN I. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, **40**, 397.
27. von HOLTEN I. — Thèse, Paris, 1955.
28. SANTENOISE D., GRANDPIERRE R., BIGET P.-L., DELAVILLE J., RAMANAMANJARY W., ROBERT M. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1958, **16**, 327.
29. ETIENNE P. — Thèse, Lille, 1954.
30. SANTENOISE D., GRANDPIERRE R., THEVENOT R., RAMANAMANJARY W., von HOLTEN I. — *C.R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 671.
31. SANTENOISE D., BIGET P.-L., RAMANAMANJARY W., SZALEWSKA C., THEVENOT R. — *C.R. Soc. Biol.*, 1958, **152**, 925.
32. SANTENOISE D., BIGET P.-L. — *Rev. Path. Gén. Comp.*, 1953, n° 644, 33.
33. PENAU H., SANTENOISE D. — *C.R. Acad. Sci.*, 1930, **191**, 342.
34. COHN E.-J. — *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349.
35. LOISELEUR J. (Techniques de Laboratoire). — Masson, 1954, vol. I, p. 828.
36. CREMER H., TISELIUS A. — *Biochem. Zeit.*, 1950, **320**, 273.
37. DELSAL J.-L., MACHEBŒUF M., SANTENOISE D., STANKOFF E. — *C.R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 51.
38. MICHEL G.-F. — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1953, **72**, 227.
39. MACHEBŒUF M., REBEYROTTE P., BRUNERIE M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 1543.
40. SVEDBERG T., PEDERSEN K.-O. — *The Ultracentrifuge*, Ed. Clarendon Press, Oxford, 1940.

41. SANTENOISE D., POLONOVSKI M., SANTENOISE Th. — **C.R. Acad. Sci.**, 1930, **231**, 1104.
42. LAMOTTE M. — Introduction à la biologie quantitative, Masson, 1948.
43. DUBERT J.-M., SLIZEWICZ P., REBEYROTTE P., MACHE-BCEUF M. — **Ann. Inst. Past.**, 1953, **84**, 370.
44. GRANDPIERRE R., GUILHEM J., SANTENOISE D., STANKOFF E., THIEBLOT L. — **C.R. Soc. Biol.**, 1945, **139**, 935.
45. RONA P. — *Praktikum der Physiologischen Chemie* Ed. Springer, 1931.
46. PFLUGER E. — *Das Glykogen*, Berlin, 1903.
47. AGID R., MIALHE P. — **J. Physiol.**, 1957, **49**, 309.
48. CAHN Th., HOUGET J. — **C.R. Acad. Sci.**, 1947, **225**, 1033.
49. LABORIT H. — *Résistance et soumission en physiologie*, Masson, 1954.
50. LOUYOT P. — Thèse, Nancy, 1930.
51. SANGER F. — **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 1955, **37**, 23.
52. MOORE S., STEIN W.-H. — **J. Biol. Chem.**, 1948, **176**, 367.
53. MELDRUM N.-U., ROUGHTON F.-J.-W. — **J. Physiol.**, 1932, **75**, 15.
54. SCOTT D.-A., MENDIVE J.-R. — **J. Biol. Chem.**, 1941, **139**, 661.
55. ALTSCHULE M.-D., LEWIS H.-D. — **J. Biol. Chem.**, 1949, **180**, 557.
56. MITCHELL C.-A., POZZANI U.-C., FESSENDEN R.-W. — **J. Biol. Chem.**, 1945, **160**, 283.
57. ALTSCHULE M.-D., LEWIS H.-D. — **Arch. Int. Med. U.S.A.**, 1949, **83**, 547.
58. LEWIS H.-D., ALTSCHULE M.-D. — **Blood J. Hematology**, 1949, **4**, 442.
59. DENIS P. — *La dissociation électrolytique de l'eau extracellulaire*. Masson, 1959.
60. TRICOT R., MAURAT J.-P. — *Les diurétiques*. Baillière, 1961.
61. VALETTE G. — *Précis de Pharmacodynamie*. Masson, 1959.
62. BERSIN Th. — *Biochimie der Hormone*. Acad. Verlag, 1960.
63. BOOTH V.-H. — **J. Physiol.**, 1938, **91**, 474.
64. VAN GOOR H. — **Arch. Néerl. Physiol.**, 1943, **27**, 393.
65. SANTENOISE D. — *Pneumogastrique et glandes endocrines*. A. Legrand, Paris, 1926.
66. LIACOPOULOS P., HALPERN B.-N., LIACOPOULOS-BRIOT M. — **C.R. Soc. Biol.**, 1957, **151**, 1661.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

Extrait pancréatique à action vagotonisante

1° Etude physicochimique de l'extrait pancréatique vagotonisant	10
2° Etude statistique du titrage de l'extrait vagotonisant et nouvelle définition de l'unité vagotonisante	22
3° Mise en évidence dans les protéines du sérum de chien d'une substance active sur le réflexe oculo-cardiaque	27
4° Action hypoglycémiante des extraits pancréatiques vagotonisants	32
5° Etude de l'action de l'extrait pancréatique à action vagotonisante sur le muscle lisse et la perméabilité capillaire	41
6° Discussion des résultats concernant l'extrait pancréatique vagotonisant	43

DEUXIÈME PARTIE

Extrait pancréatique à action respiratoire

1° Etude physicochimique de l'extrait pancréatique à action respiratoire	45
2° Etude statistique du test au CO ₂ et son application à la mise en évidence d'une fraction active sur la respiration dans les protéines sériques du chien	54
3° Inhibition de l'activité de l'anhydrase carbonique par l'extrait respiratoire	60
4° Action diurétique des extraits pancréatiques à action respiratoire	71
5° Discussion des résultats concernant l'extrait pancréatique à action respiratoire	75
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR	76
BIBLIOGRAPHIE	78

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Peptides biologiquement actifs

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 3 Mars 1963.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

